

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

30. 7. 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2003年 8月 1日

REC'D 16 SEP 2004

WIPO

PCT

出 願 番 号  
Application Number: 特願2003-285432  
[ST. 10/C]: [JP 2003-285432]

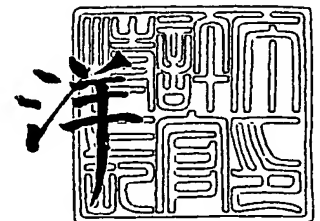
出 願 人  
Applicant(s): 独立行政法人産業技術総合研究所

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 9月 2日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 339-03281  
【提出日】 平成15年 8月 1日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 A61K 9/00  
A61K 31/00

【発明者】  
【住所又は居所】 茨城県つくば市東 1 - 1 - 1 独立行政法人産業技術総合研究所  
つくばセンター内  
【氏名】 山 嵯 登  
【発明者】  
【住所又は居所】 茨城県つくば市東 1 - 1 - 1 独立行政法人産業技術総合研究所  
つくばセンター内  
【氏名】 小 島 周二

【特許出願人】  
【識別番号】 301021533  
【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所

【代理人】  
【識別番号】 100091096  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 平 木 祐 輔

【選任した代理人】  
【識別番号】 100118773  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 藤 田 節

【選任した代理人】  
【識別番号】 100111741  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 田 中 夏 夫

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

糖鎖がリポソーム膜に結合されている糖鎖修飾リポソーム。

**【請求項 2】**

リポソームの構成脂質が、フォスファチジルコリン類（モル比 0～70%）、フォスファチジルエタノールアミン類（モル比 0～30%）、フォスファチジン酸類もしくは長鎖アルキルリン酸塩類（モル比 0～30%）、ガングリオシド類、糖脂質類もしくはフォスファチジルグリセロール類（モル比 0～40%）、およびコレステロール類（モル比 0～70%）を含む、請求項 1 記載の糖鎖修飾リポソーム。

**【請求項 3】**

糖鎖の種類および密度が制御されて結合されている、請求項 1 または 2 記載の糖鎖修飾リポソーム。

**【請求項 4】**

リポソームの粒径が 30～500nm である、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の糖鎖修飾リポソーム。

**【請求項 5】**

リポソームの粒径が 50～300nm である、請求項 4 記載の糖鎖修飾リポソーム。

**【請求項 6】**

リポソームの粒径が 70～150nm である、請求項 5 記載の糖鎖修飾リポソーム。

**【請求項 7】**

リポソームのゼータ電位が -50～10mV である、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項記載の糖鎖修飾リポソーム。

**【請求項 8】**

リポソームのゼータ電位が -40～0mV である、請求項 7 記載の糖鎖修飾リポソーム。

**【請求項 9】**

リポソームのゼータ電位が -30～-10mV である、請求項 8 記載の糖鎖修飾リポソーム。

**【請求項 10】**

糖鎖がリンカー蛋白質を介してリポソーム膜に結合されている、請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載の糖鎖修飾リポソーム。

**【請求項 11】**

リンカー蛋白質がヒト血清アルブミンまたはウシ血清アルブミンである請求項 10 記載の糖鎖修飾リポソーム。

**【請求項 12】**

リポソーム膜および／またはリンカー蛋白質が親水性化されている、請求項 1 から 11 のいずれか 1 項に記載の糖鎖修飾リポソーム。

**【請求項 13】**

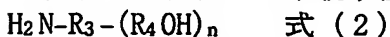
親水性化合物により親水性化され、該親水性化合物が、一般式（1）



で示される請求項 12 記載の糖鎖修飾リポソームであって、 $R_1$  は、 $C_1$  から  $C_{40}$  の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、 $R_2$  は存在しないかもしくは  $C_1$  から  $C_{40}$  の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、 $X$  はリポソーム脂質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、 $n$  は自然数を示す、糖鎖修飾リポソーム。

**【請求項 14】**

親水性化合物により親水性化され、該親水性化合物が、一般式（2）



で示される請求項 12 記載の糖鎖修飾リポソームであって、 $R_3$  は、 $C_1$  から  $C_{40}$  の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、 $R_4$  は存在しないかもしくは  $C_1$  から  $C_{40}$  の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、 $X$  はリポソーム脂質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、 $n$  は自然数を示す、糖鎖修飾リポソーム。

**【請求項 15】**

親水性化合物により親水性化され、該親水性化合物が、一般式 (3)

$$\text{H}_2\text{N}-\text{R}_5(\text{OH})_n \quad \text{式 (3)}$$

で示される請求項 12 記載の糖鎖修飾リボソームであって、 $\text{R}_5$  は、 $\text{C}_1$  から  $\text{C}_{40}$  の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、 $\text{X}$  はリボソーム脂質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、 $n$  は自然数を示す、糖鎖修飾リボソーム。

【請求項 16】

リボソーム膜および／またはリンカー蛋白質にアミノアルコールを結合させることによりリボソーム膜および／またはリンカー蛋白質が親水性化されている、請求項 12 記載の糖鎖修飾リボソーム。

【請求項 17】

リボソーム膜および／またはリンカー蛋白質にトリス (ヒドロキシメチル) アミノエタン、トリス (ヒドロキシエチル) アミノエタン、トリス (ヒドロキシプロピル) アミノエタン、トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン、トリス (ヒドロキシエチル) アミノメタン、トリス (ヒドロキシプロピル) アミノメタン、トリス (ヒドロキシメチル) アミノプロパン、トリス (ヒドロキシエチル) アミノプロパン、トリス (ヒドロキシプロピル) アミノプロパンからなる群から選択される親水性化合物を結合させることによりリボソーム膜および／またはリンカー蛋白質が親水性化されている、請求項 16 記載の糖鎖修飾リボソーム。

【請求項 18】

リボソームに結合した糖鎖の結合密度が、リンカー蛋白質を用いる場合は、リボソーム 1 粒子当たり 1 ～ 30000 個であり、リンカー蛋白質を用いない場合は、リボソーム 1 粒子当たり最高 1 ～ 500000 個である、請求項 1 から 17 のいずれか 1 項に記載の糖鎖修飾リボソーム。

【請求項 19】

リボソームに結合した糖鎖の結合密度が、リボソームに結合させる蛋白質 1 分子当たり 1 ～ 60 個である、請求項 1 から 18 のいずれか 1 項に記載の糖鎖修飾リボソーム。

【請求項 20】

請求項 1 から 19 のいずれか 1 項に記載のリボソームに薬剤を封入したリボソーム製剤。

【請求項 21】

薬剤が、アルキル化系抗癌剤、代謝拮抗剤、植物由来抗癌剤、抗癌性抗生物質、BRM・サイトカイン類、白金錯体系抗癌剤、免疫療法剤、ホルモン系抗癌剤、モノクローナル抗体等の腫瘍用薬剤、中枢神経用薬剤、末梢神経系・感覚器官用薬剤、呼吸器疾患治療薬剤、循環器用薬剤、消化器官用薬剤、ホルモン系用薬剤、泌尿器・生殖器用薬剤、外用薬剤、ビタミン・滋養強壮剤、血液・体液用薬剤、代謝性医薬品、抗生物質・化学療法薬剤、検査用薬剤、抗炎症剤、眼疾患薬剤、中枢神経系薬剤、自己免疫系薬剤、循環器系薬剤、糖尿病、高脂血症等の生活習慣病薬剤または経口、経肺、経皮膚もしくは経粘膜のための各種薬剤、副腎皮質ホルモン、免疫抑制剤、抗菌薬、抗ウイルス薬、血管新生抑制剤、サイトカインやケモカイン、抗サイトカイン抗体や抗ケモカイン抗体、抗サイトカイン・ケモカイン受容体抗体、siRNA や DNA などの遺伝子治療関連の核酸製剤、神経保護因子からなる群から選択される請求項 20 記載のリボソーム製剤。

【請求項 22】

血中、肝臓、脾臓、肺、脳、小腸、心臓、胸腺、腎臓、膵臓、筋肉、大腸、骨、骨髓、癌組織、炎症組織およびリンパ節からなる群から選択される組織または器官に指向性の高い、請求項 1 から 21 のいずれか 1 項に記載のリボソーム製剤。

【請求項 23】

リボソームが腸管吸収機能を有するものである請求項 1 から 22 のいずれか 1 項に記載の糖鎖修飾リボソーム。

【請求項 24】

糖鎖がリボソーム膜に結合されているものであって、糖鎖が、アルファ 1,2 マンノビオ

ース二糖鎖、アルファ1,3マンノビオース二糖鎖、アルファ1,4マンノビオース二糖鎖、アルファ1,6マンノビオース二糖鎖、アルファ1,3アルファ1,6マンノトリオース三糖鎖、オリゴマンノース3五糖鎖、オリゴマンノース4b六糖鎖、オリゴマンノース5七糖鎖、オリゴマンノース6八糖鎖、オリゴマンノース7九糖鎖、オリゴマンノース8十糖鎖、オリゴマンノース9十一糖鎖、3'-シアリルラクトース三糖鎖、6'-シアリルラクトース三糖鎖、3'-シアリルラクトサミン糖鎖および6'-シアリルラクトサミン糖鎖からなる群から選択される、請求項1から23のいずれか1項に記載の糖鎖修飾リポソーム。

【請求項25】

リポソームの構成脂質が、フォスファチジルコリン類（モル比0～70%）、フォスファチジルエタノールアミン類（モル比0～30%）、フォスファチジン酸類もしくは長鎖アルキルリン酸塩（モル比0～30%）、ガングリオシド類、糖脂質類もしくはフォスファチジルグリセロール類（モル比0～40%）、およびコレステロール類（モル比0～70%）を含む、リポソーム。

【請求項26】

リポソーム膜が低分子の親水性化合物により親水性化されている、請求項25記載のリポソーム。

【請求項27】

低分子の親水性化合物が少なくとも2つのOH基を有する化合物である、請求項25記載のリポソーム。

【請求項28】

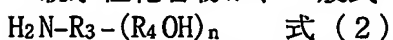
親水性化合物が、一般式(1)



で示される請求項26記載のリポソームであって、 $R_1$ は、 $C_1$ から $C_{40}$ の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、 $R_2$ は存在しないかもしくは $C_1$ から $C_{40}$ の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、 $X$ はリポソーム脂質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、 $n$ は自然数を示す、リポソーム。

【請求項29】

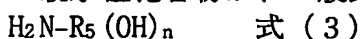
親水性化合物が、一般式(2)



で示される請求項26記載のリポソームであって、 $R_3$ は、 $C_1$ から $C_{40}$ の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、 $R_4$ は存在しないかもしくは $C_1$ から $C_{40}$ の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、 $X$ はリポソーム脂質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、 $n$ は自然数を示す、リポソーム。

【請求項30】

親水性化合物が、一般式(3)



で示される請求項26記載のリポソームであって、 $R_5$ は、 $C_1$ から $C_{40}$ の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、 $X$ はリポソーム脂質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、 $n$ は自然数を示す、リポソーム。

【請求項31】

リポソーム膜にアミノアルコールを結合させることによりリポソーム膜が親水性化されている、請求項26記載のリポソーム。

【請求項32】

リポソーム膜にトリス（ヒドロキシメチル）アミノエタン、トリス（ヒドロキシエチル）アミノエタン、トリス（ヒドロキシプロピル）アミノエタン、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、トリス（ヒドロキシエチル）アミノメタン、トリス（ヒドロキシプロピル）アミノメタン、トリス（ヒドロキシメチル）アミノプロパン、トリス（ヒドロキシエチル）アミノプロパン、トリス（ヒドロキシプロピル）アミノプロパンからなる群から選択される親水性化合物を結合させることによりリポソーム膜が親水性化されている、請求項31記載のリポソーム。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】糖鎖を有する標的指向性および腸管吸収制御性リポソーム

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、医薬品、化粧品をはじめ医学・薬学分野において応用し得る、癌などの標的細胞・組織を認識し局所的に薬剤や遺伝子を患部に送り込むための治療用のドラッグデリバリーシステムや診断用の細胞・組織センシングプローブとして利用できるものであって、特に腸管吸収性に優れた糖鎖修飾リポソーム、およびこれに薬剤あるいは遺伝子等を封入したリポソーム製剤に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

米国の国家ナノテク戦略（NNI）によって実現を目指す具体的目標の一例として、「癌細胞や標的組織を狙い撃ちする薬物や遺伝子送達システム（DDS：ドラッグデリバリーシステム）」を掲げた。日本の総合科学技術会議のナノテクノロジー・材料分野推進戦略でも、重点領域として「医療用極小システム・材料、生物のメカニズムを活用し制御するナノバイオロジー」があり、その5年間の研究開発目標の1つとして「健康寿命延伸のための生体機能材料・ピンポイント治療等技術の基本シーズ確立」が掲げられている。一方、高齢化社会となるに伴い癌の発症率・死亡率は年々増えており、新規な治療材料である標的指向DDSの開発が待望されている。その他の病気においても副作用のない標的指向DDSナノ材料の重要性が注目されており、その市場規模は近い将来に10兆円を超えると予測されている。また、これらの材料は治療とともに診断への利用においても期待されている。

## 【0003】

医薬品の治療効果は、薬物が特定の標的部位に到達し、そこで作用することにより発現される。その一方で、医薬品による副作用とは、薬物が不必要な部位に作用してしまうことである。従って、薬物を有効かつ安全に使用するためにもドラッグデリバリーシステムの開発が求められている。その中でも特に標的指向（ターゲティング）DDSとは、薬物を「体内の必要な部位に」、「必要な量を」、「必要な時間だけ」送り込むといった概念である。そのための代表的な材料としての微粒子性キャリアであるリポソームが注目されている。この粒子に標的指向機能をもたせるために、リポソームの脂質の種類、組成比、粒子径、表面電荷を変化させるなどの受動的ターゲティング法が試みられているが、いまだ本法は不十分であり更なる改良が求められている。

## 【0004】

一方、高機能のターゲティングを可能にするために、能動的ターゲティング法も試みられている。これは「ミサイルドラッグ」ともよばれ理想的なターゲティング法であるが、国内外においていまだ完成されたものはなく今後の発展が大いに期待されているものである。本法は、リポソーム膜面上にリガンドを結合させ、標的組織の細胞膜面上に存在するレセプターに特異的に認識させることによって、積極的にターゲティングを可能にさせる方法である。この能動的ターゲティング法での標的となる細胞膜面上に存在するレセプターのリガンドとしては、抗原、抗体、ペプチド、糖脂質や糖蛋白質などが考えられる。これらのうち、糖脂質や糖蛋白質の糖鎖は、生体組織の発生や形態形成、細胞の増殖や分化、生体防御や受精機構、癌化とその転移機構などの様々な細胞間コミュニケーションにおいて情報分子としての重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある。

## 【0005】

また、その標的となる各組織の細胞膜面上に存在するレセプターとしてのセレクチン、DC-SIGN、DC-SIGNR、コレクチン、マンノース結合レクチン等のC-タイプレクチン、シグレック等のIタイプレクチン、マンノース-6-リン酸受容体などのPタイプレクチン、Rタイプレクチン、Lタイプレクチン、Mタイプレクチン、ガレクチンなどの各種のレクチン（糖鎖認識蛋白質）についての研究も進んできたことから、各種の分子構造を有する糖鎖は新しいDDSリガンドとして注目されてきている (1)Yamazaki, N., Kojima, S., Bovin, N.V

., Andre, S., Gabius, S. and Gabius, H.-J. (2000) *Adv. Drug Delivery Rev.* 43, 225-244. 2) Yamazaki, N., Jigami, Y., Gabius, H.-J., Kojima, S (2001) *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 13, 319-329. <http://www.gak.co.jp/TIGG/71PDF/yamazaki.pdf>).

#### 【0006】

外膜表面にリガンドを結合したリポソームについては、癌などの標的部位に選択的に薬物や遺伝子などを送達するためのDDS材料として多くの研究がなされてきた。しかしながら、それらは、生体外では標的細胞に結合するが、生体内では期待される標的細胞や組織にターゲティングされないものがほとんどである (1) Forssen, E. and Willis, M. (1998) *Adv. Drug Delivery Rev.* 29, 249-271. 2) 高橋俊雄・橋田充編(1999)、今日のDDS・薬物送達システム、159-167頁、医薬ジャーナル社、大阪)。糖鎖の分子認識機能を利用したDDS材料の研究開発においても、糖鎖を有する糖脂質を導入したリポソームについて若干の研究が知られているが、それらの機能評価は生体外 (in vitro) によるもののみであり、糖鎖を有する糖蛋白質を導入したリポソームの研究はほとんど進んでいない (1) DeFrees, S.A., Phillips, L., Guo, L. and Zalipsky, S. (1996) *J. Am. Chem. Soc.* 118, 6101-6104. 2) Spevak, W., Foxall, C., Charych, D.H., Dasgupta, F. and Nagy, J.O. (1996) *J. Med. Chem.* 39, 1018-1020. 3) Stahn, R., Schafer, H., Kernchen, F. and Schreiber, J. (1998) *Glycobiology* 8, 311-319. 4) Yamazaki, N., Jigami, Y., Gabius, H.-J., Kojima, S (2001) *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 13, 319-329. <http://www.gak.co.jp/TIGG/71PDF/yamazaki.pdf>)。したがって、糖脂質や糖蛋白質の多種多様な糖鎖を結合したリポソームについての調製法と生体内動態 (in vivo) 解析を含めた体系的な研究は、これまで未開発で今後の進展が期待される重要課題である。

#### 【0007】

さらに新しいタイプのDDS材料研究として、投与が最も簡便・安価に行える経口投与で使用可能なDDS材料開発も重要課題である。たとえば、ペプチド性および蛋白質性医薬品などは一般的に水溶性で高分子量であり消化管の小腸粘膜透過性が低いため酵素分解を受けるなどにより経口投与してもほとんど腸管吸収されない。そこでこれらの高分子量の医薬品や遺伝子などを腸管から血液中へ送達するためのDDS材料としてリガンド結合リポソームの研究が注目されつつある (Lehr, C.-M. (2000) *J. Controlled Release* 65, 19-29)。しかしながら、これらのリガンドとして糖鎖を用いた腸管吸収制御性リポソームの研究は未だ報告されていない。

#### 【0008】

本発明者等は、既に、糖鎖がリンカー蛋白質を介してリポソーム膜に結合されており、糖鎖が、ルイスX型三糖鎖、シアリルルイスX型四糖鎖、3'-シアリルラクトサミン三糖鎖、6'-シアリルラクトサミン三糖鎖から選ばれたものであり、リポソーム膜および/またはリンカー蛋白質にトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタンが任意に結合しており親水性化されていることを特徴とする糖鎖修飾リポソームおよびラクトース2糖鎖、2'-フコシルラクトース三糖鎖、ジフコシルラクトース四糖鎖および3-フコシルラクトース三糖鎖から選ばれた糖鎖により修飾されたリポソームであって、糖鎖がリンカー蛋白質を介してリポソームに結合していてもよい、腸管吸収制御性リポソームについて特許出願を行っている。

【非特許文献1】 Yamazaki, N., Kojima, S., Bovin, N.V., Andre, S., Gabius, S. and Gabius, H.-J. (2000) *Adv. Drug Delivery Rev.* 43, 225-244.

【非特許文献2】 Yamazaki, N., Jigami, Y., Gabius, H.-J., Kojima, S (2001) *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 13, 319-329.

【非特許文献3】 Forssen, E. and Willis, M. (1998) *Adv. Drug Delivery Rev.* 29, 249-271.

【非特許文献4】 高橋俊雄・橋田充編(1999)、今日のDDS・薬物送達システム、159-167頁、医薬ジャーナル社

【非特許文献5】DeFrees, S.A., Phillips, L., Guo, L. and Zalipsky, S. (1996) J. Am. Chem. Soc. 118, 6101-6104.

【非特許文献6】Spevak, W., Foxall, C., Charych, D.H., Dasgupta, F. and Nagy, J.O. (1996) J. Med. Chem. 39, 1018-1020.

【非特許文献7】Stahn, R., Schafer, H., Kernchen, F. and Schreiber, J. (1998) Glycobiology 8, 311-319.

【非特許文献8】Yamazaki, N., Jigami, Y., Gabius, H.-J., Kojima, S (2001) Trends in Glycoscience and Glycotechnology 13, 319-329.

【非特許文献9】Lehr, C.-M. (2000) J. Controlled Release 65, 19-29

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、各種組織の細胞表面上に存在する各種のレクチン（糖鎖認識蛋白質）に対して特異的な結合活性を有する糖鎖を結合したリポソームであって、実際の生体内の細胞、組織を識別して薬剤あるいは遺伝子を効率的に輸送し得るリポソームを提供することを目的とする。さらに、本発明は、該リポソームを含む疾患治療剤の提供をも目的とする。さらに、本発明は安定性の高いリポソームの提供を目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

上記の課題を解決するために、本発明者等は、リポソームの組成について検討を行い、安定性の高いリポソームを得た。さらに、リポソームの表面に結合させる糖鎖の種類および結合密度、リンカー蛋白質、ならびにリポソームを親水化するための化合物等について種々の実験、検討を加え、糖鎖の構造により各組織への指向性を実際に制御できることに加え、リポソーム表面および／またはリンカー蛋白質を特定の親水性化合物により水和処理し、さらにリポソームに結合する糖鎖の密度を制御すれば、各組織に対するリポソームの移行量をさらに増大し得、これにより薬剤あるいは遺伝子を標的細胞、組織に効率的に輸送できることを見だし、本発明を完成するに至ったものである。

【0011】

本発明者らは、さらにこのようにして得られたリポソームを実際に疾患の治療に用いることについて鋭意検討を行い、表面に結合させた糖鎖の種類に応じて種々の組織および器官の種々の疾患に適用できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0012】

すなわち、本発明は、以下の（1）～（32）に係るものである。

〔1〕 糖鎖がリポソーム膜に結合されている糖鎖修飾リポソーム、

〔2〕 リポソームの構成脂質が、フォスファチジルコリン類（モル比0～70%）、フォスファチジルエタノールアミン類（モル比0～30%）、フォスファチジン酸類もしくは長鎖アルキルリン酸塩類（モル比0～30%）、ガングリオシド類、糖脂質類もしくはフォスファチジルグリセロール類（モル比0～40%）、およびコレステロール類（モル比0～70%）を含む、〔1〕の糖鎖修飾リポソーム、

〔3〕 糖鎖の種類および密度が制御されて結合されている、〔1〕または〔2〕の糖鎖修飾リポソーム、

【0013】

〔4〕 リポソームの粒径が30～500nmである、〔1〕から〔3〕のいずれかの糖鎖修飾リポソーム、

〔5〕 リポソームの粒径が50～300nmである、〔4〕の糖鎖修飾リポソーム、

〔6〕 リポソームの粒径が70～150nmである、〔5〕の糖鎖修飾リポソーム、

〔7〕 リポソームのゼータ電位が-50～10mVである、〔1〕から〔6〕のいずれかの糖鎖修飾リポソーム、

〔8〕 リポソームのゼータ電位が-40～0mVである、〔7〕の糖鎖修飾リポソーム、

〔9〕 リポソームのゼータ電位が-30～-10mVである、〔8〕の糖鎖修飾リポソーム、



## 【0014】

[10] 糖鎖がリンカー蛋白質を介してリポソーム膜に結合されている、[1]から[9]のいずれかの糖鎖修飾リポソーム、

[11] リンカー蛋白質がヒト血清アルブミンまたはウシ血清アルブミンである[10]の糖鎖修飾リポソーム、

[12] リポソーム膜および／またはリンカー蛋白質が親水性化されている、[1]から[11]のいずれかの糖鎖修飾リポソーム、

## 【0015】

[13] 親水性化合物により親水性化され、該親水性化合物が、一般式(1)

$X-R_1(R_2OH)_n$  式(1)

で示される[12]の糖鎖修飾リポソームであって、 $R_1$ は、 $C_1$ から $C_{40}$ の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、 $R_2$ は存在しないかもしくは $C_1$ から $C_{40}$ の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、 $X$ はリポソーム脂質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、 $n$ は自然数を示す、糖鎖修飾リポソーム、

[14] 親水性化合物により親水性化され、該親水性化合物が、一般式(2)

$H_2N-R_3-(R_4OH)_n$  式(2)

で示される[12]の糖鎖修飾リポソームであって、 $R_3$ は、 $C_1$ から $C_{40}$ の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、 $R_4$ は存在しないかもしくは $C_1$ から $C_{40}$ の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、 $X$ はリポソーム脂質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、 $n$ は自然数を示す、糖鎖修飾リポソーム、

[15] 親水性化合物により親水性化され、該親水性化合物が、一般式(3)

$H_2N-R_5(OH)_n$  式(3)

で示される[12]の糖鎖修飾リポソームであって、 $R_5$ は、 $C_1$ から $C_{40}$ の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、 $X$ はリポソーム脂質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、 $n$ は自然数を示す、糖鎖修飾リポソーム、

## 【0016】

[16] リポソーム膜および／またはリンカー蛋白質にアミノアルコールを結合させることによりリポソーム膜および／またはリンカー蛋白質が親水性化されている、[12]の糖鎖修飾リポソーム、

[17] リポソーム膜および／またはリンカー蛋白質にトリス(ヒドロキシメチル)アミノエタン、トリス(ヒドロキシエチル)アミノエタン、トリス(ヒドロキシプロピル)アミノエタン、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、トリス(ヒドロキシエチル)アミノメタン、トリス(ヒドロキシプロピル)アミノメタン、トリス(ヒドロキシメチル)アミノプロパン、トリス(ヒドロキシエチル)アミノプロパン、トリス(ヒドロキシプロピル)アミノプロパンからなる群から選択される親水性化合物を結合させることによりリポソーム膜および／またはリンカー蛋白質が親水性化されている、[16]の糖鎖修飾リポソーム、

## 【0017】

[18] リポソームに結合した糖鎖の結合密度が、リンカー蛋白質を用いる場合は、リポソーム1粒子当たり1~30000個であり、リンカー蛋白質を用いない場合は、リポソーム1粒子当たり最高1~500000個である、[1]から[17]のいずれかの糖鎖修飾リポソーム。

[19] リポソームに結合した糖鎖の結合密度が、リポソームに結合させるリンカー蛋白質1分子当たり1~60個である、[1]から[18]のいずれかの糖鎖修飾リポソーム。

[20] [1]から[19]のいずれかのリポソームに薬剤を封入したリポソーム製剤、

## 【0018】

[21] 薬剤が、アルキル化系抗癌剤、代謝拮抗剤、植物由来抗癌剤、抗癌性抗生物質、BRM・サイトカイン類、白金錯体系抗癌剤、免疫療法剤、ホルモン系抗癌剤、モノクローナル抗体等の腫瘍用薬剤、中枢神経用薬剤、末梢神経系・感覚器官用薬剤、呼吸器疾患治療薬剤、循環器用薬剤、消化器用薬剤、ホルモン系用薬剤、泌尿器・生殖器用薬剤、外用薬剤、ビタミン・滋養強壮剤、血液・体液用薬剤、代謝性医薬品、抗生物質・化学療法

薬剤、検査用薬剤、抗炎症剤、眼疾患薬剤、中枢神経系薬剤、自己免疫系薬剤、循環器系薬剤、糖尿病。高脂血症等の生活習慣病薬剤または経口・経肺もしくは経皮膚のための各種薬剤、副腎皮質ホルモン、免疫抑制剤、抗菌薬、抗ウイルス薬、血管新生抑制剤、サイトカインやケモカイン、抗サイトカイン抗体や抗ケモカイン抗体、抗サイトカイン・ケモカイン受容体抗体、siRNAやDNAなどの遺伝子治療関連の核酸製剤、神経保護因子からなる群から選択される[20]のリポソーム製剤、

[22] 血中、肝臓、脾臓、肺、脳、小腸、心臓、胸腺、腎臓、脾臓、筋肉、大腸、骨、骨髓、癌組織、炎症組織およびリンパ節からなる群から選択される組織または器官に指向性の高い、[1]から[21]のいずれかのリポソーム製剤、

[23] リポソームが腸管吸収機能を有するものである[1]から[22]のいずれかの糖鎖修飾リポソーム、

#### 【0019】

[24] 糖鎖がリポソーム膜に結合されているものであって、糖鎖が、アルファ1,2マンノビオース二糖鎖、アルファ1,3マンノビオース二糖鎖、アルファ1,4マンノビオース二糖鎖、アルファ1,6マンノビオース二糖鎖、アルファ1,3アルファ1,6マンノトリオース三糖鎖、オリゴマンノース3五糖鎖、オリゴマンノース4六糖鎖、オリゴマンノース5七糖鎖、オリゴマンノース6八糖鎖、オリゴマンノース7九糖鎖、オリゴマンノース8十糖鎖、オリゴマンノース9十一糖鎖、3'-シアリルラクトース三糖鎖、6'-シアリルラクトース三糖鎖、3'-シアリルラクトサミン糖鎖および6'-シアリルラクトサミン糖鎖からなる群から選択される、[1]から[23]のいずれかの糖鎖修飾リポソーム、

[25] リポソームの構成脂質が、フォスファチジルコリン類（モル比0～70%）、フォスファチジルエタノールアミン類（モル比0～30%）、フォスファチジン酸類もしくは長鎖アルキルリン酸塩（モル比0～30%）、ガングリオシド類、糖脂質類もしくはフォスファチジルグリセロール類（モル比0～40%）、およびコレステロール類（モル比0～70%）を含む、リポソーム、

#### 【0020】

[26] リポソーム膜が低分子の親水性化合物により親水性化されている、[25]のリポソーム、

[27] 低分子の親水性化合物が少なくとも2つのOH基を有する化合物である、[25]のリポソーム、

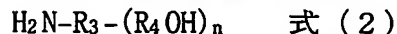
#### 【0021】

[28] 親水性化合物が、一般式(1)



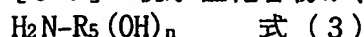
で示される[26]のリポソームであって、 $R_1$ は、 $C_1$ から $C_{40}$ の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、 $R_2$ は存在しないかもしくは $C_1$ から $C_{40}$ の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、 $X$ はリポソーム脂質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、 $n$ は自然数を示す、リポソーム、

[29] 親水性化合物が、一般式(2)



で示される[26]のリポソームであって、 $R_3$ は、 $C_1$ から $C_{40}$ の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、 $R_4$ は存在しないかもしくは $C_1$ から $C_{40}$ の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、 $X$ はリポソーム脂質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、 $n$ は自然数を示す、リポソーム、

[30] 親水性化合物が、一般式(3)



で示される[26]のリポソームであって、 $R_5$ は、 $C_1$ から $C_{40}$ の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、 $X$ はリポソーム脂質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、 $n$ は自然数を示す、リポソーム、

#### 【0022】

[31] リポソーム膜にアミノアルコールを結合させることによりリポソーム膜が親水性

化されている、[26]のリポソーム、ならびに

[32] リポソーム膜にトリス（ヒドロキシメチル）アミノエタン、トリス（ヒドロキシエチル）アミノエタン、トリス（ヒドロキシプロピル）アミノエタン、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、トリス（ヒドロキシエチル）アミノメタン、トリス（ヒドロキシプロピル）アミノメタン、トリス（ヒドロキシメチル）アミノプロパン、トリス（ヒドロキシエチル）アミノプロパン、トリス（ヒドロキシプロピル）アミノプロパンからなる群から選択される親水性化合物を結合させることによりリポソーム膜が親水性化されている、[31]のリポソーム。

【発明の効果】

【0023】

リポソームを構成する組成の種類および量を調節することにより、安定性の高いリポソームを得ることができた。さらに、特定の親水性化合物でリポソームを親水性化することにより、従来のリポソームより優れた安定性等の特性を有するリポソームを得ることができた。

【0024】

本発明の実施例に示したように、各種糖鎖とヒト血清アルブミン（リンカー）とリポソームとが結合したリポソームを作製し、マウスでの各種組織への体内動態、特に癌組織への取込についてエールリッヒ固形癌担癌マウスを用いて解析した結果、糖鎖の分子構造の差を利用することによって、実際の生体においてリポソームの各種組織への体内動態を促進あるいは抑制して制御することができ、これに基づく効率の良い癌組織をはじめとする目的組織（血中、肝臓、脾臓、肺、脳、小腸、心臓、胸腺、腎臓、脾臓、筋肉、大腸、骨、骨髓、癌組織、炎症組織、リンパ節）へのターゲティング機能をDDS材料に付与することができることが明らかとなった。このように、本発明により、医学・薬学分野において極めて有用な、標的指向性を制御し得るリポソームを提供することができた。また、この際リポソーム表面に結合させる糖鎖密度を制御することにより、より標的指向性の高い糖鎖結合リポソームを得ることができた。

【0025】

また、本発明の上記糖鎖修飾リポソームは腸管吸収性に優れ、腸管を経由するという、従来のリポソーム使用製剤にはみられない新たな投与形態で投与可能なものであるという点で画期的なものである。さらに、腸管吸収性並びに各種組織（血中、肝臓、脾臓、肺、脳、小腸、心臓、胸腺、腎臓、脾臓、筋肉、大腸、骨、骨髓、癌組織、炎症組織、リンパ節）への体内動態は、リポソームに対する糖鎖結合量の設定と、糖鎖の選択によって制御することができ、これにより、効率的、かつ副作用がなく安全に、薬剤あるいは遺伝子等を腸管そして血中経由で生体組織に移行することが可能となり、医学、薬学分野において特に有用なものである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0026】

以下、本発明をさらに詳細に説明する。

本発明は、表面に種々の糖鎖を有する標的指向性リポソームおよび腸管吸収制御性リポソームである。本発明において、標的指向性とは生体内に投与したときに特定の組織や器官または疾患部位等の標的部位に特異的に到達し取り込まれ得る性質をいう。また、腸管吸収制御性とは、腸管経由で生体内に取り込まれる性質、すなわち腸管吸収性であって、さらに取り込まれる速度、程度等を制御し得る性質をいう。

【0027】

リポソームとは、通常、膜状に集合した脂質層および内部の水層から構成される閉鎖小胞を意味する。本発明のリポソームは、図1～12および23～26に示されるように、その表面すなわち脂質層に糖鎖が、結合している、糖鎖は直接リポソームの脂質層に結合していてもよいし、ヒト血清アルブミンのようなリンカー蛋白質を介して、共有結合していてもよい。糖鎖は、その種類と密度が制御されて結合している。

【0028】

糖鎖は、本発明の腸管吸収制御性リポソームおよび本発明の標的指向性リポソームの標的組織または器官に応じて種々のものを用いることができる。

例えば、腸管吸収制御性リポソームとして、3'-シアリルラクトース三糖鎖（図23に構造式を示す。以下、同様）、6'-シアリルラクトース三糖鎖（図24）、3'-シアリルラクトサミン糖鎖（図25）および6'-シアリルラクトサミン糖鎖（図26）が挙げられ、標的指向性リポソームとしてアルファ1,2マンノビオース二糖鎖（図1）、アルファ1,3マンノビオース二糖鎖（図2）、アルファ1,4マンノビオース二糖鎖（図3）、アルファ1,6マンノビオース二糖鎖（図4）、アルファ1,3アルファ1,6マンノトリオース三糖鎖（図5）、オリゴマンノース3五糖鎖（図6）、オリゴマンノース4b六糖鎖（図7）、オリゴマンノース5七糖鎖（図8）、オリゴマンノース6八糖鎖（図9）、オリゴマンノース7九糖鎖（図10）、オリゴマンノース8十糖鎖（図11）およびオリゴマンノース9十一糖鎖（図12）が挙げられる。

#### 【0029】

本発明に用いられるリポソームについては、膜安定性をよくすること、封入される薬物や遺伝子などのものをなくすこと、膜面の親水性化処理をできるようにすること、蛋白質を各種密度で結合できるようにすること、糖鎖を各種密度で結合できるようにすること、などを可能にするために、鋭意努力をして、以下のような各種の脂質と糖脂質などを構成成分とするリポソームを作製した。本発明のリポソームを構成する脂質としては、例えば、フォスファチジルコリン類、フォスファチジルエタノールアミン類、フォスファチジン酸類もしくは長鎖アルキルリン酸塩類、ガングリオシド類、糖脂質類もしくはフォスファチジルグリセロール類、コレステロール類等が挙げられ、フォスファチジルコリン類としては、ジミリスティルフォスファチジルコリン、ジパルミトイルフォスファチジルコリン、ジステアロイルフォスファチジルコリン等が、また、フォスファチジルエタノールアミン類としては、ジミリスティルフォスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン、ジステアロイルフォスファチジルエタノールアミン等が、フォスファチジン酸類もしくは長鎖アルキルリン酸塩類としては、ジミリスティルフォスファチジン酸、ジパルミトイルフォスファチジン酸、ジステアロイルフォスファチジン酸、ジセチルリン酸等が、ガングリオシド類としては、ガングリオシドGM1、ガングリオシドGD1a、ガングリオシドGT1b等が、糖脂質類としては、ガラクトシルセラミド、グルコシルセラミド、ラクトシルセラミド、フォスファチド、グロボシド等が、フォスファチジルグリセロール類としては、ジミリスティルフォスファチジルグリセロール、ジパルミトイルフォスファチジルグリセロール、ジステアロイルフォスファチジルグリセロール等が好ましい。このうち、フォスファチジン酸類もしくは長鎖アルキルリン酸塩類、ガングリオシド類もしくは糖脂質類、コレステロール類はリポソームの安定性を上昇させる効果を有するので、構成脂質として添加するのが望ましい。

#### 【0030】

例えば、本発明のリポソームを構成する脂質として、フォスファチジルコリン類（モル比0～70%）、フォスファチジルエタノールアミン類（モル比0～30%）、フォスファチジン酸類もしくは長鎖アルキルリン酸塩（モル比0～30%）、ガングリオシド類、糖脂質類もしくはフォスファチジルグリセロール類（モル比0～40%）、およびコレステロール類（モル比0～70%）を含むものが挙げられる。リポソーム自体は、周知の方法に従い製造することができるが、これには、薄膜法、逆層蒸発法、エタノール注入法、脱水-再水和法等を挙げることができる。

#### 【0031】

また、超音波照射法、エクストルージョン法、フレンチプレス法、ホモジナイゼーション法等を用いて、リポソームの粒子径を調節することも可能である。本発明のリポソーム自体の製法について、具体的に述べると、例えば、まず、フォスファチジルコリン類、コレステロール、フォスファチジルエタノールアミン類、フォスファチジン酸類、ガングリオシド類、糖脂質類もしくはフォスファチジルグリセロール類を配合成分とする脂質と界面活性剤コール酸ナトリウムとの混合ミセルを調製する。

## 【0032】

とりわけ、フォスファチジルエタノールアミン類の配合は親水性化反応部位として、ガングリオシド類または糖脂質類またはフォスファチジルグリセロール類の配合はリンカー蛋白質の結合部位として必須のものである。そして、これにより得られる混合ミセルの限外濾過を行うことによりリポソームを作製する。

## 【0033】

本発明において使用するリポソームは、通常のもので使用できるが、その表面は親水性化されていることが望ましい。上述のようにしてリポソームを作製した後にリポソーム表面を親水性化する。リポソーム表面の親水性化は、リポソーム表面に親水性化合物を結合させることにより行う。親水性化に用いる化合物としては、低分子の親水性化合物、好ましくは少なくとも1つのOH基を有する低分子の親水性化合物、さらに好ましくは、少なくとも2つのOH基を有する低分子の親水性化合物が挙げられる。このような親水性化合物として、例えば、トリス（ヒドロキシアルキル）アミノメタン等のアミノアルコール等が挙げられ、さらに具体的には、トリス（ヒドロキシメチル）アミノエタン、トリス（ヒドロキシエチル）アミノエタン、トリス（ヒドロキシプロピル）アミノエタン、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、トリス（ヒドロキシエチル）アミノメタン、トリス（ヒドロキシプロピル）アミノメタン、トリス（ヒドロキシメチル）アミノプロパン、トリス（ヒドロキシエチル）アミノプロパン、トリス（ヒドロキシプロピル）アミノプロパン等が挙げられる。例えば、リポソーム膜の脂質フォスファチジルエタノールアミン上に架橋用の2価試薬とトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンとを用いてリポソーム表面を親水性化する。親水性化合物の一般式は、下記式（1）、式（2）、式（3）等で示される。

## 【0034】

$$X-R_1(R_2OH)_n \quad \text{式(1)}$$

$$H_2N-R_3-(R_4OH)_n \quad \text{式(2)}$$

$$H_2N-R_5(OH)_n \quad \text{式(3)}$$

## 【0035】

ここで、 $R_1$ 、 $R_3$ および $R_5$ は、 $C_1$ から $C_{40}$ 、好ましくは $C_1$ から $C_{20}$ 、さらに好ましくは $C_1$ から $C_{10}$ の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、 $R_2$ 、 $R_4$ は存在しないかもしくは $C_1$ から $C_{40}$ 、好ましくは $C_1$ から $C_{20}$ 、さらに好ましくは $C_1$ から $C_{10}$ の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示す。 $X$ はリポソーム脂質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、例えば、 $COOH$ 、 $NH$ 、 $NH_2$ 、 $CHO$ 等が挙げられる。 $n$ は自然数を示す。

## 【0036】

リポソームの親水性化は、従来公知の方法、例えば、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、無水マレイン酸共重合体等を共有結合により結合させたリン脂質を用いてリポソームを作成する方法（特開2000-302685号）等の方法を採用することによっても行うことができる。

## 【0037】

このうち、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを用いてリポソーム表面を親水性化することが特に好ましい。

本発明のトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを用いる手法は、ポリエチレングリコールなどを用いる従来の親水性化方法と比較していくつかの点で好ましい。例えば、本発明のように糖鎖をリポソーム上に結合してその分子認識機能を標的指向性に利用するものでは、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンは低分子量物質であるので従来のポリエチレングリコールなどの高分子量物質を用いる方法に比べて、糖鎖に対する立体障害となりにくく標的細胞膜面上のレクチン（糖鎖認識蛋白質）による糖鎖分子認識反応の進行を妨げないので特に好ましい。

## 【0038】

また、本発明によるリポソームは該親水化処理後においても粒径分布や成分組成、分散特性が良好であり、長時間の保存性や生体内安定性も優れているのでリポソーム製剤化し

て利用するために好ましい。

#### 【0039】

トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを用いてリポソーム表面を親水性化するには、例えばジミリストイルフォスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン、ジステアロイルフォスファチジルエタノールアミン等の脂質を用いて、常法により得たリポソーム溶液にビススルフォスクシニミデルスベラート、ジスクシニミデルグルタレート、ジチオビススクシニミデルプロピオネート、ジスクシニミデルスベラート、3,3'-ジチオビススルフォスクシニミデルプロピオネート、エチレングリコールビススクシニミデルスクシネート、エチレングリコールビススルフォスクシニミデルスクシネート等の2価試薬を加えて反応させることにより、リポソーム膜上のジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン等の脂質に2価試薬を結合させ、次いでトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを、該2価試薬の一方の結合手と反応させることにより、リポソーム表面にトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを結合せしめる。

#### 【0040】

本発明は、上記の親水性化化合物を用いて親水性化した糖鎖の結合していないリポソームそのものをも包含する。このような親水性化したリポソームは、リポソーム自体の安定性が高まり、また糖鎖を結合したときに糖鎖の認識性が高まるという利点がある。

#### 【0041】

本発明のリポソームは、例えば、リポソームの構成脂質が、フォスファチジルコリン類（モル比0～70%）、フォスファチジルエタノールアミン類（モル比0～30%）、フォスファチジン酸類もしくは長鎖アルキルリン酸塩（モル比0～30%）、ガングリオシド類、糖脂質類もしくはフォスファチジルグリセロール類（モル比0～40%）、およびコレステロール類（モル比0～70%）を含む、リポソームである。

#### 【0042】

本発明は、さらにリポソームに上記に親水性化化合物を結合させて、リポソームを親水性化する方法をも包含する。また、糖鎖の結合していない親水性化したリポソームをも包含する。糖鎖の結合していないリポソームに糖鎖を結合することにより、本発明の標的指向性リポソームまたは腸管吸収性リポソームを製造することができる。

#### 【0043】

本発明においては、上記のようにして作製したリポソームに、上記の糖鎖のいずれかを直接結合させてもよいし、さらに、糖鎖をリンカー蛋白質を介して結合させてもよい。この際、リポソームに結合させる糖鎖の種類は1種類に限らず、複数の糖鎖を結合させてもよい。この場合の複数の糖鎖は同じ組織または器官の細胞表面に共通して存在する異なるレクチンに対して結合活性を有する複数の糖鎖であってもよいし、異なる組織または器官の細胞表面に存在する異なるレクチンに対して結合活性を有する糖鎖であってもよい。前者のような複数の糖鎖を選択することにより、特定の標的組織または器官を確実に指向することができ、後者のような複数の糖鎖を選択することにより、1種類のリポソームに複数の標的を指向させることができ、マルチパースな標的指向性リポソームを得ることができる。

#### 【0044】

なお、糖鎖をリポソームに結合させるには、リポソームの製造時にリンカー蛋白質および／または糖鎖を混合し、リポソームを製造させつつ糖鎖をその表面に結合させることも可能であるが、あらかじめリポソーム、リンカー蛋白質および糖鎖を別途準備し、製造が完了したリポソームにリンカー蛋白質および／または糖鎖を結合させたほうが望ましい。これは、リポソームにリンカー蛋白質および／または糖鎖を結合させることにより、結合させる糖鎖の密度を制御できるからである。

#### 【0045】

糖鎖のリポソームへの直接結合は、以下に述べるような方法で行うことができる。

糖鎖を糖脂質として混合してリポソームを製造するか、製造後のリポソームのリン脂質に糖鎖を結合するとともに糖鎖密度を制御する。



## 【0046】

リンカー蛋白質を用いて糖鎖を結合させる場合、リンカー蛋白質としては、例えば、ヒト血清アルブミン（HSA）、ウシ血清アルブミン（BSA）等の動物の血清アルブミンが挙げられるが、特にヒト血清アルブミンを使用する場合は、各組織に対する取り込みが多いことがマウスについての実験により確かめられている。

## 【0047】

また、後述のように、本発明の標的指向性リポソームを医薬として用いる場合、該リポソームは医薬効果を有する化合物を含んでいる必要がある。該医薬効果を有する化合物は、リポソーム中に封入させるか、あるいはリポソーム表面に結合させればよいが、リンカー蛋白質として、医薬効果を有する蛋白質を用いてもよい。この場合、蛋白質がリポソームと糖鎖を結合させるためのリンカー蛋白質および医薬効果を有する蛋白質を兼ねることもある。薬効を有する蛋白質としては、生理活性蛋白質等が挙げられる。

## 【0048】

糖鎖をリンカー蛋白質を介してリポソームへ結合させるには以下に述べる方法で行えばよい。

まずリポソーム表面に蛋白質を結合させる。リポソームを、 $\text{NaIO}_4$ 、 $\text{Pb}(\text{O}_2\text{CC}_2\text{H}_5)_4$ 、 $\text{NaBiO}_3$ 等の酸化剤で処理して、リポソーム膜面に存在するガングリオシドを酸化し、次いで、 $\text{NaBH}_3\text{CN}$ 、 $\text{NaBH}_4$ 等の試薬を用いて、リンカー蛋白質とリポソーム膜面上のガングリオシドを、還元的アミノ化反応により結合させる。このリンカー蛋白質も、親水性化するのが好ましく、これにはリンカー蛋白質にヒドロキシ基を有する化合物を結合させるが、例えば、ビススルフォスクシニミダルスベラート、ジスクシニミダルグルタレート、ジチオビススクシニミダルプロピオネート、ジスクシニミダルスベラート、3,3'-ジチオビススルフォスクシニミダルプロピオネート、エチレングリコールビススクシニミダルスクシネート、エチレングリコールビススルフォスクシニミダルスクシネート等の2価試薬を用いて、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンをリポソーム上のリンカー蛋白質と結合させればよい。

## 【0049】

これを具体的に述べると、まず、リンカー蛋白質の全てのアミノ基に架橋用2価試薬の一端を結合する。そして、各種糖鎖の還元末端をグリコシルアミノ化反応して得られる糖鎖グリコシルアミン化合物を調製し、この糖鎖のアミノ基とリポソーム上の上記で結合された架橋2価試薬の一部分の他の未反応末端とを結合する。

## 【0050】

次に、このようにして得られる糖鎖結合リポソーム膜面上蛋白質の表面に糖鎖が結合していない未反応で残っている大部分の2価試薬未反応末端を用いて親水性化処理を行う。つまり、このリポソーム上蛋白質に結合している2価試薬の未反応末端とトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン等の上述の親水性化に用いる化合物との結合反応を行い、リポソーム表面全体を親水性化する。

## 【0051】

リポソーム表面およびリンカー蛋白質の親水性化は、各種組織への移行性、および血中における滞留性および各種組織への移行性を向上させる。これは、リポソーム表面およびリンカー蛋白質表面が親水性化されることによって、糖鎖以外の部分が、各組織等においてはあたかも生体内水分であるかのように見え、これにより、標的以外の組織等に認識されず、糖鎖のみがその標的組織のレクチン（糖鎖認識蛋白質）により認識されることに起因するものと思われる。

## 【0052】

次いで、糖鎖をリポソーム上のリンカー蛋白質に結合させる。これには、糖鎖を構成する糖類の還元末端を、 $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 、 $\text{NH}_2\text{COONH}_4$ 等のアンモニウム塩を用いてグリコシルアミノ化し、次いで、ビススルフォスクシニミダルスベラート、ジスクシニミダルグルタレート、ジチオビススクシニミダルプロピオネート、ジスクシニミダルスベラート、3,3'-ジチオビススルフォスクシニミダルプロピオネート、エチレングリコールビスス

クシニミデルスクシネート、エチレングリコールビススルホスクシニミデルスクシネート等の2価試薬を用いて、リポソーム膜面上に結合したリンカー蛋白質と、上記グリコシルアミノ化された糖鎖とを結合させ、図1～12および23～26に示されるようなリポソームを得る。なお、これらの糖鎖は市販されている。

#### 【0053】

本発明のリポソームの粒径は、30～500nm、好ましくは50～300nm、さらに好ましくは70～150nmである。また、ゼータ電位は、-50～10mV、好ましくは-40～0mV、さらに好ましくは-30～-10mVである。本発明の医薬組成物に含まれるリポソーム製造の過程において、表面に何も結合していないリポソーム、親水性化されておらず糖鎖が結合したリポソーム、糖鎖が結合しておらず親水性化されたリポソームおよび親水性化され糖鎖が結合したリポソームの4つの態様のリポソームが存在し得るが、これらの4つの態様のリポソームが生理食塩水などの等張液において前記粒径の範囲およびゼータ電位の範囲に包含される。

#### 【0054】

さらに、糖鎖を結合させた場合の糖鎖の結合密度は、リポソームに結合させるリンカー蛋白質1分子当り1～60個、好ましくは1～40個、さらに好ましくは1～20個である。また、リポソーム1粒子当りは、リンカー蛋白質を用いる場合は、1～30000個、好ましくは1～20000個、さらに好ましくは1～10000個、あるいは100～30000個、好ましくは100～20000個、さらに好ましくは100～10000個、あるいは500～30000個、好ましくは500～20000個、さらに好ましくは500～10000個である。リンカー蛋白質を用いない場合は、リポソーム1粒子当り最高1～500000個、好ましくは1～300000個、さらに好ましくは1～100000個以上の糖鎖を結合させることができる。

#### 【0055】

本発明においては、使用する糖鎖の構造と糖鎖結合量を種々選択することにより、各標的細胞、組織に対する指向性を制御することができる。

また、糖鎖の種類と糖鎖結合量によっては腸管での吸収制御性を高めることもできる。腸管吸収制御性を高める糖鎖と特定の組織または器官への指向性を有する糖鎖の両方をリポソームに結合させることにより、特定組織または器官への指向性と腸管吸収制御性の両方の特性を併せ持ったリポソームを作製することができる。

#### 【0056】

上述のように、本発明の標的指向性リポソームは糖鎖の種類と糖鎖結合量により特異的に結合するレクチンが決まり、特定の組織または器官に特異的に到達する。また、糖鎖構造と糖鎖結合量を選択することにより癌組織等の疾患部位に到達させることも可能である。

#### 【0057】

本発明においては、使用する糖鎖の構造と糖鎖結合量を種々選択することにより、各標的細胞、組織に対する指向性を制御することができる。本発明のリポソームは、糖鎖により血中、肝臓、脾臓、肺、脳、小腸、心臓、胸腺、腎臓、脾臓、筋肉、大腸、骨、骨髓、癌組織、炎症組織およびリンパ節等の組織または器官を指向する。例えば、実施例における図13、16、17、18、21および22が示すように、アルファ1,2マンノビオース二糖鎖、アルファ1,3マンノビオース二糖鎖、アルファ1,4マンノビオース二糖鎖、アルファ1,6マンノビオース二糖鎖、アルファ1,3アルファ1,6マンノトリオース三糖鎖、オリゴマンノース3五糖鎖、オリゴマンノース4b六糖鎖、オリゴマンノース5七糖鎖、オリゴマンノース6八糖鎖、オリゴマンノース7九糖鎖、オリゴマンノース8十糖鎖およびオリゴマンノース9十一糖鎖を結合したリポソームはすべて血中、肺、脳、癌組織、心臓および小腸への指向性が高い。また、図14が示すように、アルファ1,2マンノビオース二糖鎖、オリゴマンノース3五糖鎖、オリゴマンノース4b六糖鎖を結合したリポソームは肝臓への指向性が高い。また、図15が示すようにアルファ1,2マンノビオース二糖鎖、アルファ1,3マンノビオース二糖鎖、アルファ1,3アルファ1,6マンノトリオース三糖鎖を結合したリポソームは脾臓への指向性が高い。また、図19が示すようにアルファ1,2マンノビオース三糖鎖、アルファ1,4マンノビオース二糖鎖、アルファ1,6マンノビオース二



糖鎖を結合したリポソームはリンパ節への指向性が高い。さらに、オリゴマンノース 6 糖鎖を結合したリポソームは胸腺への指向性が高い。

#### 【0058】

また、本発明の図 23～26 に示されるリポソームは、全般的に腸管吸収性は極めて高いものの、さらに、リポソーム上の糖鎖の密度の調節を行うことにより、腸管吸収性を制御し、より効率的に標的部位へ薬剤を移行させることが可能となり、副作用の軽減化を図ることができる。例えば、実施例における図 27～30 においては、上記 4 種の糖鎖修飾リポソームにおける糖鎖結合量を 3 段階に変更した場合における、腸管から血中への移行性（すなわち腸管吸収性）を示す。

#### 【0059】

なお、この糖鎖結合量の変更は、リンカー蛋白質結合リポソームに対して糖鎖を 3 段階の濃度で (1)50 $\mu$ g、2)200 $\mu$ g、3)1mg) で結合せしめることにより行ったものである。これによれば、6'-シアリルラクトース三糖鎖、6'-シアリルラクトサミン糖鎖の場合、糖鎖密度を高くするにつれ、腸管吸収性が順次低下するが、3'-シアリルラクトース三糖鎖、3'-シアリルラクトサミン糖鎖の場合は腸管吸収性が逆に上昇する。これらのことは、腸管吸収性は、リポソーム上の糖鎖の結合量により、糖鎖の種類毎に異なることを示す。したがって、糖鎖の種類毎にリポソーム上の糖鎖結合量を適宜設定することにより、腸管吸収性を制御することが可能となる。

#### 【0060】

本発明のリポソームに、医薬効果を有する化合物を含ませることにより、特定の組織または器官にリポソームが到達し、その組織または器官の細胞にリポソームが取り込まれ、医薬効果を有する化合物を放出し、医薬効果を奏する。

#### 【0061】

医薬効果を有する化合物は限定されず、公知の蛋白質、公知の医薬化合物を広く用いることが可能である。抗癌剤等の特定の疾患に対する医薬化合物等を含ませることにより、本発明のリポソームを特定の疾患の治療薬として用いることができる。さらに、本発明のリポソームに含める医薬効果を有する化合物としては、遺伝子治療用 DNA、RNA、siRNA 等が挙げられる。

#### 【0062】

本発明のリポソームに含ませる医薬化合物としては、アルキル化系抗癌剤、代謝拮抗剤、植物由来抗癌剤、抗癌性抗生物質、BRM・サイトカイン類、白金錯体系抗癌剤、免疫療法剤、ホルモン系抗癌剤、モノクローナル抗体等の腫瘍用薬剤、中枢神経用薬剤、末梢神経系・感覚器官用薬剤、呼吸器疾患治療薬剤、循環器用薬剤、消化器官用薬剤、ホルモン系用薬剤、泌尿器・生殖器用薬剤、外用薬剤、ビタミン・滋養強壮剤、血液・体液用薬剤、代謝性医薬品、抗生物質・化学療法薬剤、検査用薬剤、抗炎症剤、眼疾患薬剤、中枢神経系薬剤、自己免疫系薬剤、循環器系薬剤、糖尿病、高脂血症等の生活習慣病薬剤または経口、経肺、経皮膚もしくは経粘膜のための各種薬剤、副腎皮質ホルモン、免疫抑制剤、抗菌薬、抗ウイルス薬、血管新生抑制剤、サイトカインやケモカイン、抗サイトカイン抗体や抗ケモカイン抗体、抗サイトカイン・ケモカイン受容体抗体、siRNA や DNA などの遺伝子治療関連の核酸製剤、神経保護因子等が挙げられる。

#### 【0063】

例えば、腫瘍用薬剤として、塩酸ナイトロジェンマスタード-N-オキシド、シクロホスファミド、イホスファミド、ブルスファン、塩酸ニムスチン、ミトプロニトール、メルファラン、ダカルバジン、ラニムスチン、リン酸エストラムスチンナトリウムなどのアルキル化剤、メルカプトプリン、チオイノシン（メルカプトプリンリボシド）、メトトレキサート、エノシタピン、シタラピン、塩酸アンシタピン（塩酸サイクロシチジン）、フルオロウラシル、5-FU、テガフル、ドキシフルリジン、カルモフルなどの代謝拮抗剤、エトポシド、硫酸ビンブラスチン、硫酸ピンクリスチン、硫酸ビンデシン、パクリタキセル、タキソール、塩酸イリノテカン、塩酸ノギテカンなどのアルカロイド等の植物由来抗癌剤、アクチノマイシン D、マイトマイシン C、クロモマイシン A<sub>3</sub>、塩酸プレオマイシン

、硫酸ブレオマイシン、硫酸ペプロマイシン、塩酸ダウノルビシン、塩酸ドキソルビシン、塩酸アクリルビシン（アクリシノマイシンA）、塩酸ピラルビシン、塩酸エピルビシン、ネオカルチノスタチンなどの抗癌性抗生物質、その他、塩酸ミトキサントロン、カルボプラチン、シスプラチン、L-アスパラギナーゼ、アセグラトン、塩酸プロカルバジン、クエン酸タモキシフェン、ウベニメクス、レンチナン、シゾフィラン、酢酸メドロキシprogesteron、ホスフェストロール、メピチオスタン、エピチオスタノール等がある。

#### 【0064】

上述のような薬剤を含ませることにより、本発明のリポソームを、癌、炎症等の疾患の治療に用いることができる。

なお、医薬効果を有する化合物は、リポソームの中に封入させてもよいし、リポソーム表面に結合させてもよい。例えば、蛋白質は上記のリンカー蛋白質の結合方法と同じ方法で表面に結合させることが可能であり、他の化合物もその化合物が有する官能基を利用することにより、公知の方法で、結合させることができる。また、リポソーム内部への封入は、以下の方法により行う。リポソームへ薬剤等を封入するには、周知の方法を用いればよく、例えば、薬剤等の含有溶液とフォスファチジルコリン類、フォスファチジエタノールアミン類、フォスファチジン酸類もしくは長鎖アルキルリン酸塩類、ガングリオシド類、糖脂質類もしくはフォスファチジルグリセロール類およびコレステロール類を含む脂質を用いてリポソームを形成することにより、薬剤等はリポソーム内に封入される。

#### 【0065】

したがって、本発明のリポソームに、治療あるいは診断に供しうる薬剤あるいは遺伝子を封入することによって得られるリポソーム製剤は、ガン組織、炎症組織、各種組織への移行性が選択的に制御されたものであり、治療薬剤あるいは診断剤の標的細胞、組織への集中による効力の増強あるいは他の細胞、組織に対する薬剤の取り込みの減少による副作用の軽減化等を図れるものである。

#### 【0066】

本発明の糖鎖修飾リポソームは、医薬組成物として、種々の形態で投与することができる。このような投与形態としては、点眼剤等による点眼投与、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等による経口投与、あるいは注射剤、点滴剤、座薬などによる非経口投与を挙げることができる。かかる組成物は、公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤、賦形剤を含む。たとえば、錠剤用の担体、賦形剤としては、ゲル化剤、乳糖、ステアリン酸マグネシウムなどが使用される。注射剤は、本発明の糖鎖結合リポソームを通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが使用され、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール、プロピレングリコールなどのポリアルコール、非イオン界面活性剤などと併用しても良い。油性液としては、ゴマ油、大豆油などが使用され、溶解補助剤としては安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用しても良い。

#### 【0067】

本発明の医薬組成物の投与経路は、限定されず、点眼、経口投与、静脈注射、筋肉注射等がある。投与量は、疾患の重篤度等により適宜決定できるが、本発明の組成物の医薬的に有効量を患者に投与する。ここで、「医薬的に有効量を投与する」とは、各種疾患を治療するのに適切なレベルの薬剤を患者に投与することをいう。本発明の医薬組成物の投与回数は適宜患者の症状に応じて選択される。

#### 【0068】

また、本発明の医薬組成物を診断用に用いる場合は、リポソームに蛍光色素、放射性化合物等の標識化合物を結合させる。該標識化合物結合リポソームが患部に結合し、標識化合物が患部細胞に取り込まれ、該標識化合物の存在を指標に疾患を検出・診断することができる。

#### 【0069】

本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって

限定されるものではない。

【実施例 1】

【0070】

リポソームの調製

リポソームは既報の手法 (Yamazaki, N., Kodama, M. and Gabius, H.-J. (1994) *Methods Enzymol.* 242, 56-65) により、改良型コール酸透析法を用いて調製した。すなわち、ジパルミトイルフォスファチジルコリン、コレステロール、ジセチルフォスフェート、ガングリオシド及びジパルミトイルフォスファチジリエタノールアミンをモル比でそれぞれ 35:40:5:15:5 の割合の合計脂質量 45.6mg にコール酸ナトリウムを 46.9mg 添加し、クロロホルム/メタノール溶液 3ml に溶解した。この溶液を蒸発させ、沈殿物を真空中で乾燥させることによって脂質膜を得た。得られた脂質膜を TAPS 緩衝液 (pH 8.4) 3ml に懸濁、超音波処理して、透明なミセル懸濁液を得た。さらに、ミセル懸濁液を PM10 膜 (Amicon Co., USA) と PBS 緩衝液 (pH 7.2) を用いた限外濾過にかけ均一リポソーム (平均粒径 100nm) 10ml を調製した。

【実施例 2】

【0071】

リポソーム脂質膜面上の親水性化処理

実施例 1 で調製したリポソーム溶液 10ml を XM300 膜 (Amicon Co., USA) と CBS 緩衝液 (pH 8.5) を用いた限外濾過にかけ溶液の pH を 8.5 にした。次に、架橋試薬 bis(sulfosuccinimidyl)suberate (BS<sup>3</sup>; Pierce Co., USA) 10ml を加え、25℃ で 2 時間攪拌した。その後、更に 7℃ で一晩攪拌してリポソーム膜上の脂質ジパルミトイルフォスファチジリエタノールアミンと BS<sup>3</sup> との化学結合反応を完結した。そして、このリポソーム液を XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過にかけた。次に、CBS 緩衝液 (pH 8.5) 1ml に溶かした tris(hydroxymethyl)aminomethane 40mg をリポソーム液 10ml に加えて、25℃ で 2 時間攪拌後、7℃ で一晩攪拌してリポソーム膜上の脂質に結合した BS<sup>3</sup> と tris(hydroxymethyl)aminomethane との化学結合反応を完結した。これにより、リポソーム膜の脂質ジパルミトイルフォスファチジリエタノールアミン上に tris(hydroxymethyl)aminomethane の水酸基が配位して水和親水性化された。

【実施例 3】

【0072】

リポソーム膜面上へのヒト血清アルブミン (HSA) の結合

既報の手法 (Yamazaki, N., Kodama, M. and Gabius, H.-J. (1994) *Methods Enzymol.* 242, 56-65) により、カップリング反応法を用いて行った。すなわち、この反応は 2 段階化学反応で行い、まずはじめに、実施例 2 で得られた 10ml のリポソーム膜面上に存在するガングリオシドを 1ml の TAPS 緩衝液 (pH 8.4) に溶かしたメタ過ヨウ素酸ナトリウム 43mg を加えて室温で 2 時間攪拌して過ヨウ素酸酸化した後、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 8.0) で限外濾過することにより酸化されたリポソーム 10ml を得た。このリポソーム液に、20mg のヒト血清アルブミン (HSA) を加えて 25℃ で 2 時間攪拌し、次に PBS (pH 8.0) に 2M NaBH<sub>3</sub>CN 100μl を加えて 10℃ で一晩攪拌してリポソーム上のガングリオシドと HSA とのカップリング反応で HSA を結合した。そして、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過をした後、HSA 結合リポソーム液 10ml を得た。

【実施例 4】

【0073】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上へのアルファ 1,2 マンノビオース二糖鎖の結合

アルファ 1,2 マンノビオース二糖鎖 (Calbiochem Co., USA) 50μg を 0.25g の NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> を溶かした 0.5ml 水溶液に加え、37℃ で 3 日間攪拌した後、0.45μm のフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してアルファ 1,2 マンノビオース二糖鎖のグリコシルアミン化合物 50μg を得た。次に、実施例 3 で得たリポソーム液の一部 1ml に架橋試薬 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate) (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mg を加えて 25℃

で2時間、続いて7℃で一晩攪拌し、XM300膜とCBS緩衝液(pH 8.5)で限外濾過してDTSSPがリポソーム上のHSAに結合したリポソーム1mlを得た。次に、このリポソーム液に上記のアルファ1,2マンノピオース二糖鎖のグリコシルアミン化合物50 $\mu$ gを加えて、25℃で2時間攪拌し、その後7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPにアルファ1,2マンノピオース二糖鎖の結合を行った。その結果、図1で示されるアルファ1,2マンノピオース二糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム(略称:A2) 2ml(総脂質量2mg、総蛋白量200 $\mu$ g、平均粒径100nm)が得られた。

【実施例5】

【0074】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン(HSA)上へのアルファ1,3マンノピオース二糖鎖の結合

アルファ1,3マンノピオース二糖鎖(Calbiochem Co.,USA)50 $\mu$ gを0.25gのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>を溶かした0.5ml水溶液に加え、37℃で3日間攪拌した後、0.45 $\mu$ mのフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してアルファ1,3マンノピオース二糖鎖のグリコシルアミン化合物50 $\mu$ gを得た。次に、実施例3で得たリポソーム液の一部分1mlに架橋試薬3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate (DTSSP; Pierce Co.,USA)1mgを加えて25℃で2時間、続いて7℃で一晩攪拌し、XM300膜とCBS緩衝液(pH 8.5)で限外濾過してDTSSPがリポソーム上のHSAに結合したリポソーム1mlを得た。次に、このリポソーム液に上記のアルファ1,3マンノピオース二糖鎖のグリコシルアミン化合物50 $\mu$ gを加えて、25℃で2時間攪拌し、その後7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPにアルファ1,3マンノピオース二糖鎖の結合を行った。その結果、図2で示されるアルファ1,3マンノピオース二糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム(略称:A3) 2ml(総脂質量2mg、総蛋白量200 $\mu$ g、平均粒径100nm)が得られた。

【実施例6】

【0075】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン(HSA)上へのアルファ1,4マンノピオース二糖鎖の結合

アルファ1,4マンノピオース二糖鎖(Calbiochem Co.,USA)50 $\mu$ gを0.25gのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>を溶かした0.5ml水溶液に加え、37℃で3日間攪拌した後、0.45 $\mu$ mのフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してアルファ1,4マンノピオース二糖鎖のグリコシルアミン化合物50 $\mu$ gを得た。次に、実施例3で得たリポソーム液の一部分1mlに架橋試薬3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate (DTSSP; Pierce Co.,USA)1mgを加えて25℃で2時間、続いて7℃で一晩攪拌し、XM300膜とCBS緩衝液(pH 8.5)で限外濾過してDTSSPがリポソーム上のHSAに結合したリポソーム1mlを得た。次に、このリポソーム液に上記のアルファ1,4マンノピオース二糖鎖のグリコシルアミン化合物50 $\mu$ gを加えて、25℃で2時間攪拌し、その後7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPにアルファ1,4マンノピオース二糖鎖の結合を行った。その結果、図3で示されるアルファ1,4マンノピオース二糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム(略称:A4) 2ml(総脂質量2mg、総蛋白量200 $\mu$ g、平均粒径100nm)が得られた。

【実施例7】

【0076】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン(HSA)上へのアルファ1,6マンノピオース二糖鎖の結合

アルファ1,6マンノピオース二糖鎖(Calbiochem Co.,USA)50 $\mu$ gを0.25gのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>を溶かした0.5ml水溶液に加え、37℃で3日間攪拌した後、0.45 $\mu$ mのフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してアルファ1,6マンノピオース二糖鎖のグリコシルアミン化合物50 $\mu$ gを得た。次に、実施例3で得たリポソーム液の一部分1mlに架橋試薬3,3

3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mgを加えて25℃で2時間、続いて7℃で一晩攪拌し、XM300膜とCBS緩衝液(pH 8.5)で限外濾過してDTSSPがリポソーム上のHSAに結合したリポソーム1mlを得た。次に、このリポソーム液に上記のアルファ1,6マンノピオース二糖鎖のグリコシルアミン化合物50 $\mu$ gを加えて、25℃で2時間攪拌し、その後7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPにアルファ1,6マンノピオース二糖鎖の結合を行った。その結果、図4で示されるアルファ1,6マンノピオース二糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム(略称:A6) 2ml(総脂質量2mg、総蛋白量200 $\mu$ g、平均粒径100nm)が得られた。

#### 【実施例8】

##### 【0077】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン(HSA)上へのアルファ1,3アルファ1,6マンノトリオース三糖鎖の結合

アルファ1,3アルファ1,6マンノトリオース三糖鎖(Calbiochem Co., USA) 50 $\mu$ gを0.25gのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>を溶かした0.5ml水溶液に加え、37℃で3日間攪拌した後、0.45 $\mu$ mのフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してアルファ1,3アルファ1,6マンノトリオース三糖鎖のグリコシルアミン化合物50 $\mu$ gを得た。次に、実施例3で得たリポソーム液の一部分1mlに架橋試薬3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mgを加えて25℃で2時間、続いて7℃で一晩攪拌し、XM300膜とCBS緩衝液(pH 8.5)で限外濾過してDTSSPがリポソーム上のHSAに結合したリポソーム1mlを得た。次に、このリポソーム液に上記のアルファ1,3アルファ1,6マンノトリオース三糖鎖のグリコシルアミン化合物50 $\mu$ gを加えて、25℃で2時間攪拌し、その後7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPにアルファ1,3アルファ1,6マンノトリオース三糖鎖の結合を行った。その結果、図5で示されるアルファ1,3アルファ1,6マンノトリオース三糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム(略称:A36) 2ml(総脂質量2mg、総蛋白量200 $\mu$ g、平均粒径100nm)が得られた。

#### 【実施例9】

##### 【0078】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン(HSA)上へのオリゴマンノース3五糖鎖の結合

オリゴマンノース3五糖鎖(Calbiochem Co., USA) 50 $\mu$ gを0.25gのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>を溶かした0.5ml水溶液に加え、37℃で3日間攪拌した後、0.45 $\mu$ mのフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してオリゴマンノース3五糖鎖のグリコシルアミン化合物50 $\mu$ gを得た。次に、実施例3で得たリポソーム液の一部分1mlに架橋試薬3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mgを加えて25℃で2時間、続いて7℃で一晩攪拌し、XM300膜とCBS緩衝液(pH 8.5)で限外濾過してDTSSPがリポソーム上のHSAに結合したリポソーム1mlを得た。次に、このリポソーム液に上記のオリゴマンノース3五糖鎖のグリコシルアミン化合物50 $\mu$ gを加えて、25℃で2時間攪拌し、その後7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPにオリゴマンノース3五糖鎖の結合を行った。その結果、図6で示されるオリゴマンノース3五糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム(略称:Man3) 2ml(総脂質量2mg、総蛋白量200 $\mu$ g、平均粒径100nm)が得られた。

#### 【実施例10】

##### 【0079】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン(HSA)上へのオリゴマンノース4b六糖鎖の結合

オリゴマンノース4b六糖鎖(Calbiochem Co., USA) 50 $\mu$ gを0.25gのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>を溶かした0.5ml水溶液に加え、37℃で3日間攪拌した後、0.45 $\mu$ mのフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してオリゴマンノース4b六糖鎖のグリコシルアミン化合物50

$\mu\text{g}$ を得た。次に、実施例 3 で得たりポソーム液の一部分 1ml に架橋試薬 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mg を加えて 25℃ で 2 時間、続いて 7℃ で一晩攪拌し、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過して DTSSP がリポソーム上の HSA に結合したリポソーム 1ml を得た。次に、このリポソーム液に上記のオリゴマンノース 4 b 六糖鎖のグリコシルアミン化合物 50  $\mu\text{g}$  を加えて、25℃ で 2 時間攪拌し、その後 7℃ で一晩攪拌し、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP にオリゴマンノース 4 b 六糖鎖の結合を行った。その結果、図 7 で示されるオリゴマンノース 4 b 六糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム (略称: Man 4b) 2ml (総脂質量 2mg、総蛋白量 200  $\mu\text{g}$ 、平均粒径 100nm) が得られた。

#### 【実施例 11】

##### 【0080】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上へのオリゴマンノース 5 七糖鎖の結合

オリゴマンノース 5 七糖鎖 (Calbiochem Co., USA) 50  $\mu\text{g}$  を 0.25g の  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  を溶かした 0.5 ml 水溶液に加え、37℃ で 3 日間攪拌した後、0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してオリゴマンノース 5 七糖鎖のグリコシルアミン化合物 50  $\mu\text{g}$  を得た。次に、実施例 3 で得たりポソーム液の一部分 1ml に架橋試薬 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mg を加えて 25℃ で 2 時間、続いて 7℃ で一晩攪拌し、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過して DTSSP がリポソーム上の HSA に結合したリポソーム 1ml を得た。次に、このリポソーム液に上記のオリゴマンノース 5 七糖鎖のグリコシルアミン化合物 50  $\mu\text{g}$  を加えて、25℃ で 2 時間攪拌し、その後 7℃ で一晩攪拌し、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP にオリゴマンノース 5 七糖鎖の結合を行った。その結果、図 8 で示されるオリゴマンノース 5 七糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム (略称: Man 5) 2ml (総脂質量 2mg、総蛋白量 200  $\mu\text{g}$ 、平均粒径 100nm) が得られた。

#### 【実施例 12】

##### 【0081】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上へのオリゴマンノース 6 八糖鎖の結合

オリゴマンノース 6 八糖鎖 (Calbiochem Co., USA) 50  $\mu\text{g}$  を 0.25g の  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  を溶かした 0.5 ml 水溶液に加え、37℃ で 3 日間攪拌した後、0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してオリゴマンノース 6 八糖鎖のグリコシルアミン化合物 50  $\mu\text{g}$  を得た。次に、実施例 3 で得たりポソーム液の一部分 1ml に架橋試薬 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mg を加えて 25℃ で 2 時間、続いて 7℃ で一晩攪拌し、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過して DTSSP がリポソーム上の HSA に結合したリポソーム 1ml を得た。次に、このリポソーム液に上記のオリゴマンノース 6 八糖鎖のグリコシルアミン化合物 50  $\mu\text{g}$  を加えて、25℃ で 2 時間攪拌し、その後 7℃ で一晩攪拌し、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP にオリゴマンノース 6 八糖鎖の結合を行った。その結果、図 9 で示されるオリゴマンノース 6 八糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム (略称: Man 6) 2ml (総脂質量 2mg、総蛋白量 200  $\mu\text{g}$ 、平均粒径 100nm) が得られた。

#### 【実施例 13】

##### 【0082】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上へのオリゴマンノース 7 九糖鎖の結合

オリゴマンノース 7 九糖鎖 (Calbiochem Co., USA) 50  $\mu\text{g}$  を 0.25g の  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  を溶かした 0.5 ml 水溶液に加え、37℃ で 3 日間攪拌した後、0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してオリゴマンノース 7 九糖鎖のグリコシルアミン化合物 50  $\mu\text{g}$  を得た。次に、実施例 3 で得たりポソーム液の一部分 1ml に架橋試薬 3,3'-dithiobis(sul



fosuccinimidyl propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mgを加えて25℃で2時間、続いて7℃で一晩攪拌し、XM300膜とCBS緩衝液(pH 8.5)で限外濾過してDTSSPがリポソーム上のHSAに結合したリポソーム1mlを得た。次に、このリポソーム液に上記のオリゴマンノース7九糖鎖のグリコシルアミン化合物50 $\mu$ gを加えて、25℃で2時間攪拌し、その後7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPにオリゴマンノース7九糖鎖の結合を行った。その結果、図10で示されるオリゴマンノース7九糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム(略称: Man 7) 2ml(総脂質量2mg、総蛋白量200 $\mu$ g、平均粒径100nm)が得られた。

【実施例14】

【0083】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン(HSA)上へのオリゴマンノース8十糖鎖の結合

オリゴマンノース8十糖鎖(Calbiochem Co., USA)50 $\mu$ gを0.25gのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>を溶かした0.5ml水溶液に加え、37℃で3日間攪拌した後、0.45 $\mu$ mのフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してオリゴマンノース8十糖鎖のグリコシルアミン化合物50 $\mu$ gを得た。次に、実施例3で得たリポソーム液の一部分1mlに架橋試薬3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mgを加えて25℃で2時間、続いて7℃で一晩攪拌し、XM300膜とCBS緩衝液(pH 8.5)で限外濾過してDTSSPがリポソーム上のHSAに結合したリポソーム1mlを得た。次に、このリポソーム液に上記のオリゴマンノース8十糖鎖のグリコシルアミン化合物50 $\mu$ gを加えて、25℃で2時間攪拌し、その後7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPにオリゴマンノース8十糖鎖の結合を行った。その結果、図11で示されるオリゴマンノース8十糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム(略称: Man 8) 2ml(総脂質量2mg、総蛋白量200 $\mu$ g、平均粒径100nm)が得られた。

【実施例15】

【0084】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン(HSA)上へのオリゴマンノース9十一糖鎖の結合

オリゴマンノース9十一糖鎖(Calbiochem Co., USA)50 $\mu$ gを0.25gのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>を溶かした0.5ml水溶液に加え、37℃で3日間攪拌した後、0.45 $\mu$ mのフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してオリゴマンノース9十一糖鎖のグリコシルアミン化合物50 $\mu$ gを得た。次に、実施例3で得たリポソーム液の一部分1mlに架橋試薬3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mgを加えて25℃で2時間、続いて7℃で一晩攪拌し、XM300膜とCBS緩衝液(pH 8.5)で限外濾過してDTSSPがリポソーム上のHSAに結合したリポソーム1mlを得た。次に、このリポソーム液に上記のオリゴマンノース9十一糖鎖のグリコシルアミン化合物50 $\mu$ gを加えて、25℃で2時間攪拌し、その後7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPにオリゴマンノース9十一糖鎖の結合を行った。その結果、図12で示されるオリゴマンノース9十一糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム(略称: Man 9) 2ml(総脂質量2mg、総蛋白量200 $\mu$ g、平均粒径100nm)が得られた。

【実施例16】

【0085】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン(HSA)上へのtris(hydroxymethyl)aminomethaneの結合

比較試料としてのリポソームを調製するために、実施例3で得たリポソーム液の一部分1mlに架橋試薬3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mgを加えて25℃で2時間、続いて7℃で一晩攪拌し、XM300膜とCBS緩衝液(pH 8.5)で限外濾過してDTSSPがリポソーム上のHSAに結合したリポソーム1mlを得た。次に、このリポソーム液にtris(hydroxymethyl)aminomethane(Wako Co., Japan) 13mgを加えて、25℃で2時間

攪拌し、その後7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPにtris(hydroxymethyl)aminomethaneの結合を行った。その結果、図31で示されるtris(hydroxymethyl)aminomethaneとヒト血清アルブミンとリポソームとが結合した比較試料としてのリポソーム(略称: TRIS) 2ml(総脂質量2mg、総蛋白量200 $\mu$ g、平均粒径100nm)が得られた。

【実施例17】

【0086】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン(HSA)上の親水性化処理

実施例4～15において調製された12種類の糖鎖が結合したリポソームについて、それぞれ別々に以下の手順によりリポソーム上のHSA蛋白質表面の水和性化処理を行った。

12種の糖鎖結合リポソーム2mlに、別々に、tris(hydroxymethyl)aminomethane 13mgを加えて、25℃で2時間、その後7℃で一晩攪拌した後、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過し未反応物を除去して、最終産物である水和性化処理された12種類の糖鎖結合リポソーム複合体(略称: A2、A3、A4、A6、A36、Man3、Man4、Man5、Man6、Man7、Man8、Man9)を各2mlを得た。

【実施例18】

【0087】

各種の糖鎖結合リポソーム複合体によるレクチン結合活性阻害効果の測定

実施例4～15および実施例17で調製した12種の糖鎖結合リポソーム複合体のin vitroでのレクチン結合活性は、常法(Yamazaki, N. (1999) Drug Delivery System, 14, 498-505)に従いレクチン固定化マイクロプレートを用いた阻害実験で測定した。すなわち、レクチン(Con A; R&D Systems Co., USA)を96穴マイクロプレートに固定化した。このレクチン固定化プレートに、比較リガンドであるビオチン化したフェチュイン0.1 $\mu$ gとともに、濃度の異なる各種の糖鎖結合リポソーム複合体(蛋白質質量として、0.01 $\mu$ g、0.04 $\mu$ g、0.11 $\mu$ g、0.33 $\mu$ g、1 $\mu$ g)を加え、4℃で2時間インキュベートした。PBS(pH 7.2)で3回洗浄した後、horseradish peroxidase(HRPO)結合ストレプトアビジンを添加し、さらに4℃で1時間インキュベート、PBS(pH 7.2)で3回洗浄し、ペルオキシダーゼ基質を添加して室温で静置、405nmの吸光度をマイクロプレートリーダー(Molecular Devices Corp., USA)で測定した。フェチュインのビオチン化は、sulfo-NHS-biotin reagent(Pierce Co., USA)処理後、Centricon-30(Amicon Co., USA)により精製した。HRPO結合ストレプトアビジンは、HRPOの酸化とNaBH<sub>3</sub>CNを用いた還元アミノ化法によるストレプトアビジンの結合により調製した。この測定結果を表1に示す。

【0088】



【表 1】

## 標的指向性リボソーム

表 1: 各種の糖鎖結合リボソーム複合体がレクチン結合活性阻害効果を示す実験結果

リボソーム 複合体	リボソーム複合体の各濃度 (μg 蛋白質) における阻害効果 (吸光度)				
	0.006 μg	0.02 μg	0.06 μg	0.17 μg	0.5 μg
A2	0.192	0.196	0.192	0.169	0.155
A3	0.178	0.178	0.178	0.170	0.142
A4	0.192	0.196	0.192	0.175	0.153
A6	0.182	0.196	0.182	0.169	0.151
A36	0.205	0.215	0.205	0.192	0.150
Man3	0.201	0.211	0.201	0.177	0.144
Man4	0.171	0.203	0.171	0.157	0.148
Man5	0.215	0.221	0.215	0.196	0.164
Man6	0.210	0.222	0.210	0.207	0.125
Man7	0.213	0.214	0.213	0.183	0.137
Man8	0.211	0.216	0.211	0.188	0.132
Man9	0.208	0.211	0.208	0.186	0.135

## 【実施例 19】

## 【0089】

クロラミンT法による各種糖鎖結合リボソームの<sup>125</sup>I標識

クロラミンT (Wako Pure Chemical Co., Japan) 溶液並びに二亜硫酸ナトリウム溶液をそれぞれ3mg/ml 並びに5mg/ml となるように用事調製して用いた。実施例 4 から 16 において調製した 12 種の糖鎖結合リボソーム並びにtris(hydroxymethyl)aminomethane結合リボソームとを50 μl ずつ別々にエッペンチューブに入れ、続いて<sup>125</sup>I-NaI (NEN Life Science Product, Inc. USA) を15 μl、クロラミンT溶液を10 μl 加え反応させた。5 分ごとにクロラミンT溶液10 μl を加え、この操作を2 回繰り返した後15 分後に還元剤として二亜硫酸ナトリウム100 μl 加え、反応を停止させた。次に、Sephadex G-50 (Pharmacia Biotech, Sweden) カラムクロマト上に乗せ、PBS で溶出、標識体を精製した。最後に、非標識-リボソーム複合体を添加して比活性 (4 x 10<sup>6</sup> Bq/mg protein) を調整して13 種類の<sup>125</sup>I標識リボソーム液を得た。

## 【実施例 20】

## 【0090】

各種の糖鎖結合リボソーム複合体の担癌マウスでの各組織への分布量の測定

Ehrlich ascites tumor (EAT) 細胞 (約2×10<sup>7</sup> 個) を雄性ddY マウス (7 週齢) 大腿部皮下に移植し、癌組織が0.3~0.6gに発育 (6~8 日後) したものを本実験に用いた。この担癌マウスに実施例 19 により<sup>125</sup>I標識した 12 種の糖鎖並びにtris(hydroxymethyl)aminomethane結合リボソーム複合体0.2mlを蛋白質量として3 μg/一匹の割合となるように尾静脈に注入投与し、60 分後に組織 (血液、肝臓、脾臓、肺、脳、癌組織、癌の周囲の炎症組織、リンパ節) を摘出、各組織の放射能をガンマカウンタ (Aloka ARC 300) で測定した。なお、各組織への放射能分布量は、投与全放射能に対する各組織1g 当たりの放射能の割合 (%投与量 /g組織) で表示した。この結果を図 13~図 22 に示す。

## 【実施例 21】

## 【0091】

リボソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上への3'-シアリルラクトース三糖鎖の結合 (糖鎖結合量が異なるもの3 種類)

3'-シアリルラクトース三糖鎖 (Wako Pure Chemical Co., Japan) (1)50 μg、又は、2) 200 μg、又は、3) 1mg) を0.25gのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>を溶かした0.5ml水溶液に加え、37℃で3日間攪

拌した後、0.45 $\mu$ mのフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結して3'-シアリルラクトース三糖鎖のグリコシルアミン化合物50 $\mu$ gを得た。次に、実施例3で得たりポソーム液の一部分1mlに架橋試薬3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate, (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mgを加えて25℃で2時間、続いて7℃で一晩攪拌し、XM300膜とCBS緩衝液(pH 8.5)で限外濾過してDTSSPがリポソーム上のHSAに結合したりポソーム1mlを得た。次に、このリポソーム液に上記の3'-シアリルラクトース三糖鎖のグリコシルアミン化合物50 $\mu$ gを加えて、25℃で2時間攪拌し、その後7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPに3'-シアリルラクトース三糖鎖の結合を行った。その結果、糖鎖結合量が異なるもの3種類の図22で示される3'-シアリルラクトース三糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したりポソーム(略称: 1) 3SL-1, 2) 3SL-2, 3) 3SL-3) 各2ml(総脂質量2mg、総蛋白量200 $\mu$ g、平均粒径100nm)が得られた。

#### 【実施例22】

##### 【0092】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン(HSA)上への6'-シアリルラクトース三糖鎖の結合(糖鎖結合量が異なるもの3種類)

6'-シアリルラクトース三糖鎖(Wako Pure Chemical Co., Japan) (1)50 $\mu$ g、又は、2)200 $\mu$ g、又は、3)1mg)を0.25gのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>を溶かした0.5ml水溶液に加え、37℃で3日間攪拌した後、0.45 $\mu$ mのフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結して6'-シアリルラクトース三糖鎖のグリコシルアミン化合物50 $\mu$ gを得た。次に、実施例3で得たりポソーム液の一部分1mlに架橋試薬3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mgを加えて25℃で2時間、続いて7℃で一晩攪拌し、XM300膜とCBS緩衝液(pH 8.5)で限外濾過してDTSSPがリポソーム上のHSAに結合したりポソーム1mlを得た。次に、このリポソーム液に上記の6'-シアリルラクトース三糖鎖のグリコシルアミン化合物50 $\mu$ gを加えて、25℃で2時間攪拌し、その後7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPに6'-シアリルラクトース三糖鎖の結合を行った。その結果、糖鎖結合量が異なるもの3種類の図23で示される6'-シアリルラクトース三糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したりポソーム(略称: 1) 6SL-1, 2) 6SL-2, 3) 6SL-3) 各2ml(総脂質量2mg、総蛋白量200 $\mu$ g、平均粒径100nm)が得られた。

#### 【実施例23】

##### 【0093】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン(HSA)上への3'-シアリルラクトサミン糖鎖の結合(糖鎖結合量が異なるもの3種類)

3'-シアリルラクトサミン糖鎖(Wako Pure Chemical Co., Japan) (1)50 $\mu$ g、又は、2)200 $\mu$ g、又は、3)1mg)を0.25gのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>を溶かした0.5ml水溶液に加え、37℃で3日間攪拌した後、0.45 $\mu$ mのフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結して3'-シアリルラクトサミン糖鎖のグリコシルアミン化合物50 $\mu$ gを得た。次に、実施例3で得たりポソーム液の一部分1mlに架橋試薬3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mgを加えて25℃で2時間、続いて7℃で一晩攪拌し、XM300膜とCBS緩衝液(pH 8.5)で限外濾過してDTSSPがリポソーム上のHSAに結合したりポソーム1mlを得た。次に、このリポソーム液に上記の3'-シアリルラクトサミン糖鎖のグリコシルアミン化合物50 $\mu$ gを加えて、25℃で2時間攪拌し、その後7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPに3'-シアリルラクトサミン糖鎖の結合を行った。その結果、糖鎖結合量が異なるもの3種類の図24で示される3'-シアリルラクトサミン糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したりポソーム(略称: 1) 3SLN-1, 2) 3SLN-2, 3) 3SLN-3) 各2ml(総脂質量2mg、総蛋白量200 $\mu$ g、平均粒径100nm)が得られた。

#### 【実施例24】

##### 【0094】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上への6'-シアリルラクトサミン糖鎖の結合 (糖鎖結合量が異なるもの3種類)

6'-シアリルラクトサミン糖鎖 (Wako Pure Chemical Co., Japan) (1)50 $\mu$ g、又は、2)200 $\mu$ g、又は、3)1mg) を0.25gのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>を溶かした0.5ml水溶液に加え、37℃で3日間攪拌した後、0.45 $\mu$ mのフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結して6'-シアリルラクトサミン糖鎖のグリコシルアミン化合物50 $\mu$ gを得た。次に、(実施例3)で得たりポソーム液の一部分1mlに架橋試薬3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate) (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mgを加えて25℃で2時間、続いて7℃で一晩攪拌し、XM300膜とCBS緩衝液(pH 8.5)で限外濾過してDTSSPがリポソーム上のHSAに結合したりポソーム1mlを得た。次に、このリポソーム液に上記の6'-シアリルラクトサミン糖鎖のグリコシルアミン化合物50 $\mu$ gを加えて、25℃で2時間攪拌し、その後7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPに6'-シアリルラクトサミン糖鎖の結合を行った。その結果、糖鎖結合量が異なるもの3種類の図25で示される6'-シアリルラクトサミン糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したりポソーム (略称: 1) 6SLN-1、2) 6SLN-2、3) 6SLN-3) 各2ml (総脂質量2mg、総蛋白量200 $\mu$ g、平均粒径100nm) が得られた。

#### 【実施例25】

##### 【0095】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上の親水性化処理

実施例21~24の手段により調整された各12種類の糖鎖が結合したりポソームについて、それぞれ別々に以下の手順によりリポソーム上のHSA 蛋白質表面の親水性化処理を行った。12種の糖鎖結合リポソーム2mlに、別々に、tris(hydroxymethyl)aminomethane 13mgを加えて、25℃で2時間、その後7℃で一晩攪拌した後、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過し未反応物を除去して、最終産物である親水性化処理された12種類の糖鎖結合リポソーム複合体 (略称: 3SL-2、3SL-2、3SL-3、6SL-1、6SL-2、6SL-3、3SLN-1、3SLN-2、3SLN-3、6SLN-1、6SLN-2、6SLN-3) 各2ml (総脂質量2mg、総蛋白量200 $\mu$ g、平均粒径100nm) を得た。

#### 【実施例26】

##### 【0096】

各種の糖鎖結合リポソーム複合体によるレクチン結合活性阻害効果の測定

実施例21~24および実施例16の手段により調製した各12種の糖鎖結合リポソーム複合体のin vitroでのレクチン結合活性は、常法(Yamazaki, N. (1999) Drug Delivery System, 14, 498-505)に従いレクチン固定化マイクロプレートを用いた阻害実験で測定した。すなわち、レクチン(E-selectin; R&D Systems Co., USA)を96穴マイクロプレートに固定化した。このレクチン固定化プレートに、比較リガンドであるビオチン化したフコシル化フェチュイン0.1 $\mu$ gとともに、濃度の異なる各種の糖鎖結合リポソーム複合体 (蛋白質量として、0.01 $\mu$ g、0.04 $\mu$ g、0.11 $\mu$ g、0.33 $\mu$ g、1 $\mu$ g) を加え、4℃で2時間インキュベートした。PBS(pH 7.2)で3回洗浄した後、horseradish peroxidase (HRPO) 結合ストレプトアビジンを添加し、さらに4℃で1時間インキュベート、PBS(pH 7.2)で3回洗浄し、ペルオキシダーゼ基質を添加して室温で静置、405nmの吸光度をマイクロプレートリーダー (Molecular Devices Corp., USA) で測定した。フコシル化フェチュインのビオチン化は、sulf o-NHS-biotin reagent (Pierce Co., USA) 処理後、Centricon-30 (Amicon Co., USA) により精製した。HRPO結合ストレプトアビジンは、HRPOの酸化とNaBH<sub>3</sub>CNを用いた還元アミノ化法によるストレプトアビジンの結合により調製した。この測定結果を表2に示す。

##### 【0097】

【表 2】

## 腸管吸収制御性リポソーム

表 2

リポソーム 複合体	リポソーム複合体の各濃度 ( $\mu\text{g}$ 蛋白質) における阻害効果 (吸光度)				
	0.01 $\mu\text{g}$	0.04 $\mu\text{g}$	0.11 $\mu\text{g}$	0.33 $\mu\text{g}$	1 $\mu\text{g}$
3SL-1	0.154	0.147	0.135	0.120	0.097
3SL-2	0.149	0.142	0.124	0.118	0.098
3SL-3	0.214	0.214	0.210	0.183	0.167
6SL-1	0.177	0.171	0.167	0.160	0.114
6SL-2	0.196	0.184	0.169	0.160	0.159
6SL-3	0.214	0.207	0.196	0.192	0.183
3SLN-1	0.219	0.198	0.180	0.164	0.119
3SLN-2	0.155	0.155	0.151	0.119	0.096
3SLN-3	0.216	0.198	0.187	0.146	0.132
6SLN-1	0.257	0.246	0.233	0.200	0.151
6SLN-2	0.250	0.250	0.230	0.199	0.158
6SLN-3	0.248	0.231	0.227	0.201	0.144

## 【実施例 27】

## 【0098】

クロラミンT法による各種糖鎖結合リポソームの $^{125}\text{I}$ 標識

クロラミンT (Wako Pure Chemical Co., Japan) 溶液並びに二亜硫酸ナトリウム溶液をそれぞれ3mg/ml 並びに5mg/ml となるように用事調製して用いた。実施例 21 から 24 および実施例 16 により調製した 13 種の糖鎖結合リポソーム並びにtris(hydroxymethyl)aminomethane結合リポソームとを50  $\mu\text{l}$  ずつ別々にエッペンチューブに入れ、続いて $^{125}\text{I}$ -NaI (NEN Life Science Product, Inc. USA) を15  $\mu\text{l}$ 、クロラミンT溶液を10  $\mu\text{l}$  加え反応させた。5 分ごとにクロラミンT溶液10  $\mu\text{l}$  を加え、この操作を2 回繰り返した後15 分後に還元剤として二亜硫酸ナトリウム100  $\mu\text{l}$  加え、反応を停止させた。次に、Sephadex G-50 (Pharmacia Biotech. Sweden) カラムクロマト上に乗せ、PBS で溶出、標識体を精製した。最後に、非標識-リポソーム複合体を添加して比活性 ( $4 \times 10^6$  Bq/mg protein) を調整して 13 種類の $^{125}\text{I}$ 標識リポソーム液を得た。

## 【実施例 28】

## 【0099】

各種の糖鎖結合リポソーム複合体のマウスでの腸管から血中への移行量の測定

一昼夜水分以外絶食した雄性ddYマウス (7週齢) に、実施例 27 により $^{125}\text{I}$ 標識された 13 種の糖鎖結合並びにtris(hydroxymethyl)aminomethane結合リポソーム複合体0.2ml を蛋白質量として3  $\mu\text{g}$ /一匹の割合になるように、マウス用経口ゾンデで腸管内に強制投与した後、10分後にネンプタル麻酔下で下大動脈より血液1mlを採血した。そして、血中の $^{125}\text{I}$ 放射能をガンマーカウンター (Alola ARC300) で測定した。さらに、各種のリポソーム複合体の生体内安定性を調べる目的で、各血液の血清をSephadex G-50で再クロマトしたが、いずれも大半の放射能が高分子量のボイドフラクションにみられ、各種のリポソーム複合体は生体内においても安定性を有していた。なお、腸管から血中への放射能移行量は、投与全放射能に対する血液1ml当たりの放射能の割合 (%投与量/ml血液) で表示した。この結果を図 27 から図 31 に示す。

## 【産業上の利用可能性】

## 【0100】

本発明の標的指向性リポソームは、適切な医薬効果を有する化合物を封入することにより、体内でリポソーム表面に結合している糖鎖が認識・結合し得るレクチンを発現している組織・器官に到達し細胞に取り込まれ、そこで医薬効果を有する化合物がその効果を発

揮し、治療薬および診断薬として用いることができる。また、本発明の腸管吸収制御性リポソームは腸管から容易に吸収され、その後標的指向性リポソームと同様に体内で封入された医薬効果を有する物質がその効果を迅速に発揮し得る。

【図面の簡単な説明】

【0101】

【図1】 アルファ1,2マンノビオース二糖鎖（A2糖鎖）を結合した標的指向制御性リポソームの模式図を示す図である。

【図2】 アルファ1,3マンノビオース二糖鎖（A3糖鎖）を結合した標的指向制御性リポソームの模式図を示す図である。

【図3】 アルファ1,4マンノビオース二糖鎖（A4糖鎖）を結合した標的指向制御性リポソームの模式図を示す図である。

【図4】 アルファ1,6マンノビオース二糖鎖（A6糖鎖）を結合した標的指向制御性リポソームの模式図を示す図である。

【図5】 アルファ1,3アルファ1,6マンノトリオース三糖鎖（A36糖鎖）を結合した標的指向制御性リポソームの模式図を示す図である。

【図6】 オリゴマンノース 3 五糖鎖（Man3糖鎖）を結合した標的指向制御性リポソームの模式図を示す図である。

【図7】 オリゴマンノース 4 b 六糖鎖（Man4b糖鎖）を結合した標的指向制御性リポソームの模式図を示す図である。

【図8】 オリゴマンノース 5 七糖鎖（Man5糖鎖）を結合した標的指向制御性リポソームの模式図を示す図である。

【図9】 オリゴマンノース 6 八糖鎖（Man6糖鎖）を結合した標的指向制御性リポソームの模式図を示す図である。

【図10】 オリゴマンノース 7 九糖鎖（Man7糖鎖）を結合した標的指向制御性リポソームの模式図を示す図である。

【図11】 オリゴマンノース 8 十糖鎖（Man8糖鎖）を結合した標的指向制御性リポソームの模式図を示す図である。

【図12】 オリゴマンノース 9 十一糖鎖（Man9糖鎖）を結合した標的指向制御性リポソームの模式図を示す図である。

【図13】 13種のリポソーム複合体の静脈内投与60分後の血中への分布量を示す図である。

【図14】 13種のリポソーム複合体の静脈内投与60分後の肝臓への分布量を示す図である。

【図15】 13種のリポソーム複合体の静脈内投与60分後の脾臓への分布量を示す図である。

【図16】 13種のリポソーム複合体の静脈内投与60分後の肺への分布量を示す図である。

【図17】 13種のリポソーム複合体の静脈内投与60分後の脳への分布量を示す図である。

【図18】 13種のリポソーム複合体の静脈内投与60分後の癌組織への分布量を示す図である。

【図19】 13種のリポソーム複合体の静脈内投与60分後のリンパ節への分布量を示す図である。

【図20】 13種のリポソーム複合体の静脈内投与60分後の胸腺への分布量を示す図である。

【図21】 13種のリポソーム複合体の静脈内投与60分後の心臓への分布量を示す図である。

【図22】 13種のリポソーム複合体の静脈内投与60分後の小腸への分布量を示す図である。

【図23】 3'-シアリルラクトース三糖鎖（3SL糖鎖）を結合した標的指向制御性リポ

ソームの模式図を示す図である。

【図 2 4】6'-シアリルラクトース三糖鎖（6SL糖鎖）を結合した標的指向制御性リポソームの模式図を示す図である。

【図 2 5】3'-シアリルラクトサミン糖鎖（3SLN糖鎖）を結合した標的指向制御性リポソームの模式図を示す図である。

【図 2 6】6'-シアリルラクトサミン糖鎖（6SLN糖鎖）を結合した標的指向制御性リポソームの模式図を示す図である。

【図 2 7】4種のリポソーム複合体の腸管内投与10分後の血中への移行量を示す図である。

【図 2 8】4種のリポソーム複合体の腸管内投与10分後の血中への移行量を示す図である。

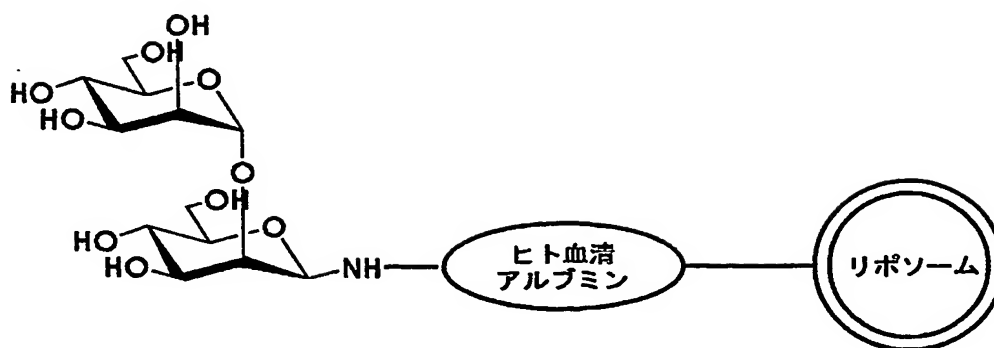
【図 2 9】4種のリポソーム複合体の腸管内投与10分後の血中への移行量を示す図である。

【図 3 0】4種のリポソーム複合体の腸管内投与10分後の血中への移行量を示す図である。

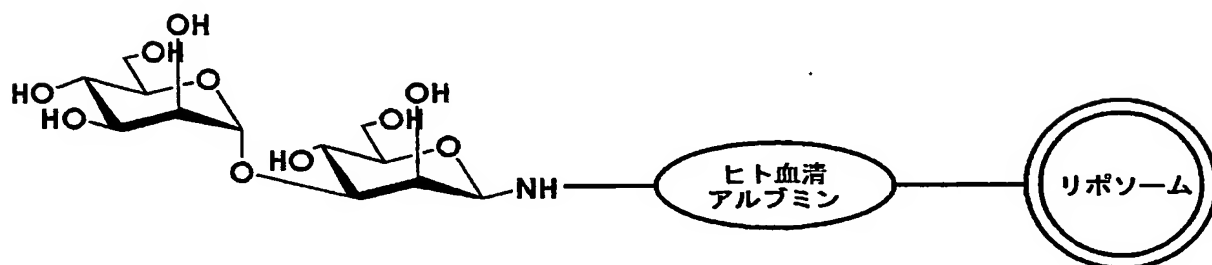
【図 3 1】比較試料としてのtris(hydroxymethyl)aminomethaneを結合したリポソームの模式図である。

【書類名】 図面

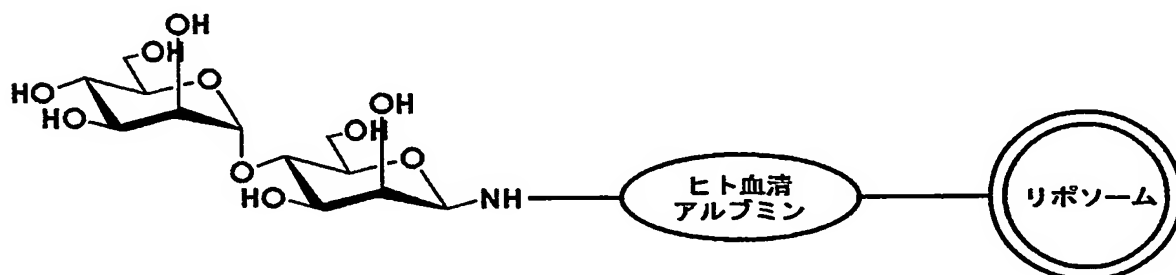
【図 1】



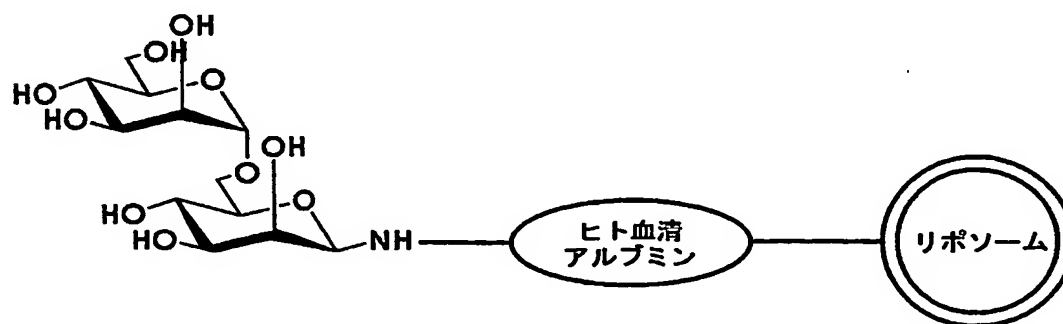
【図 2】



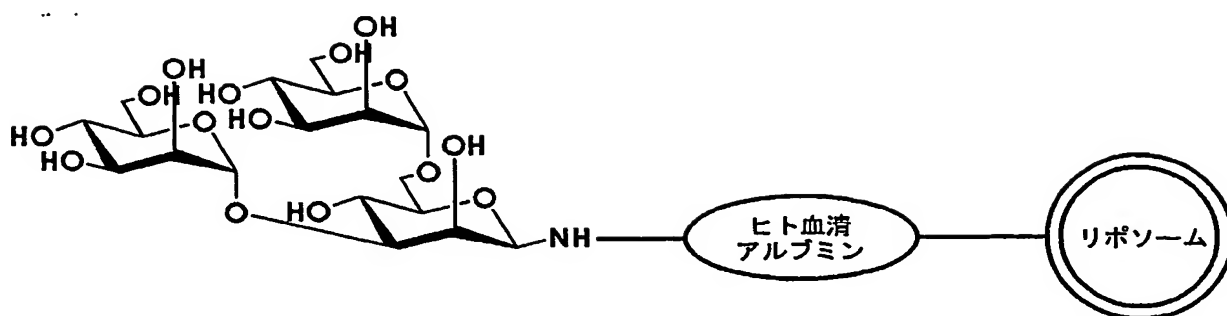
【図 3】



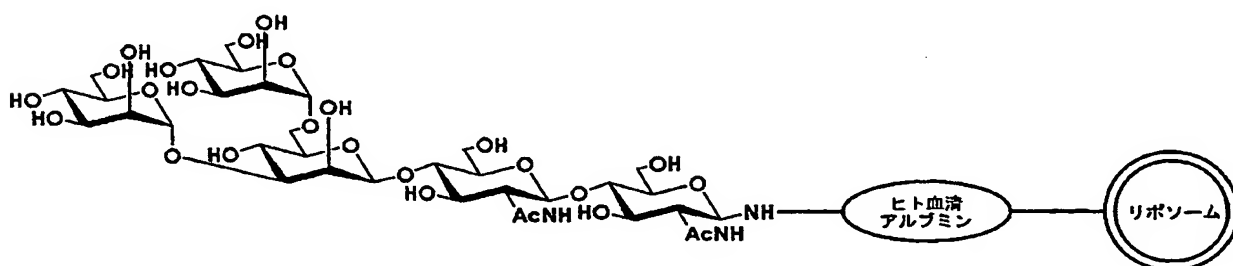
【図 4】



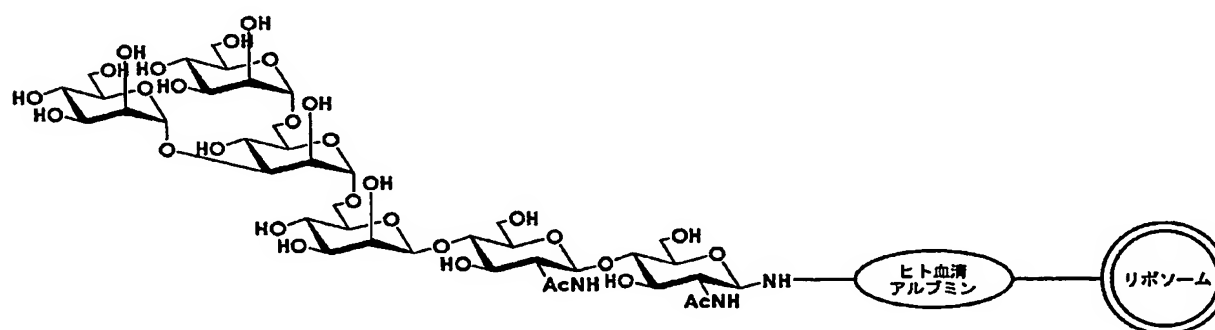
【図 5】



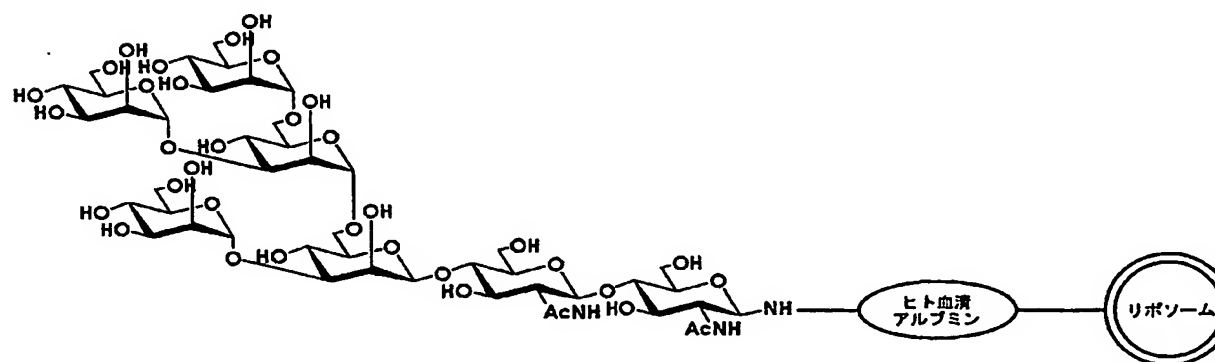
【図 6】



【図 7】

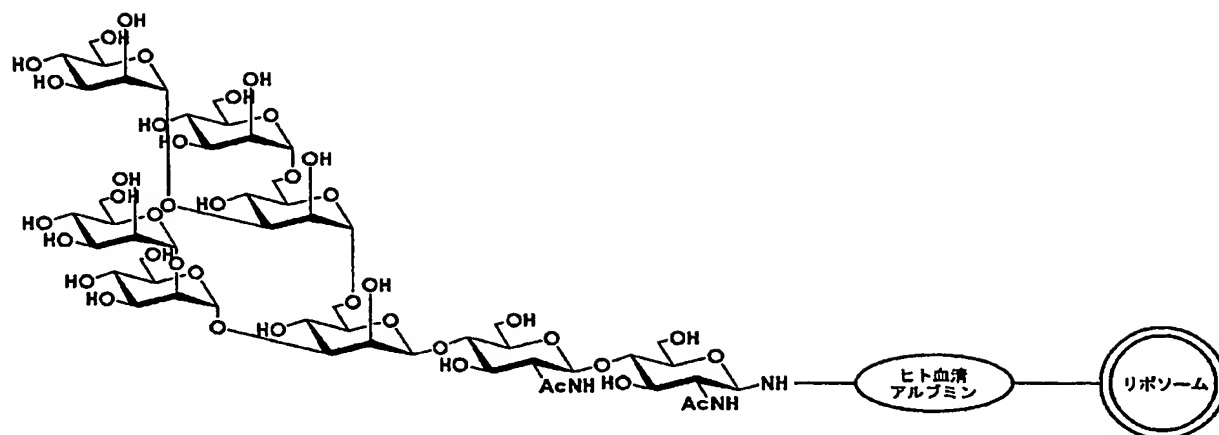


【図 8】

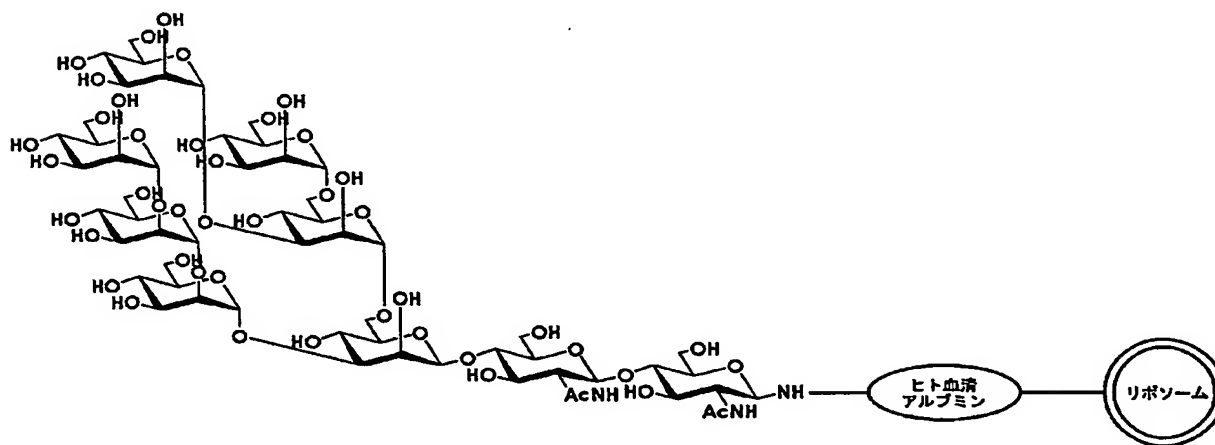




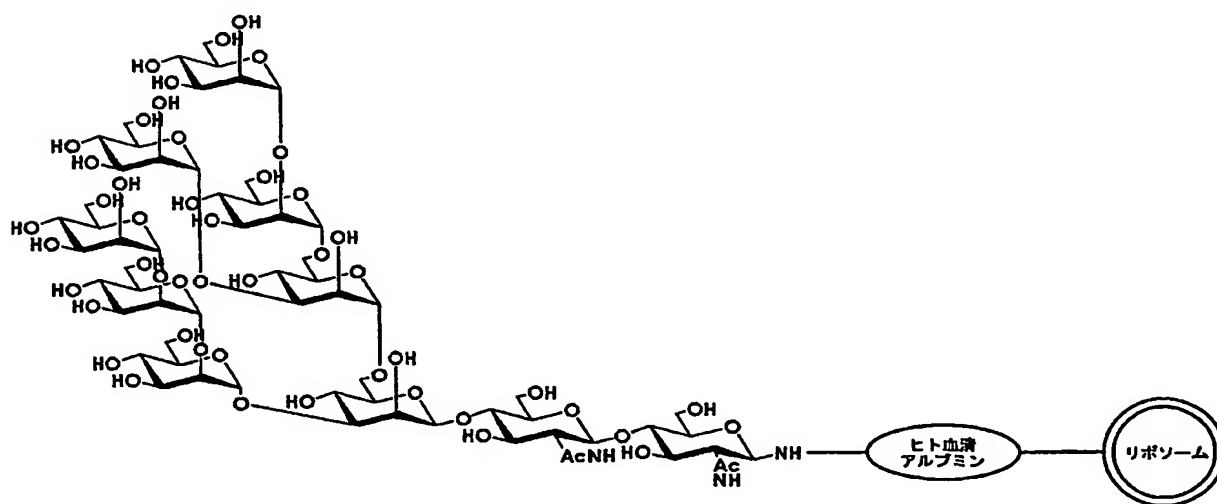
【図 9】



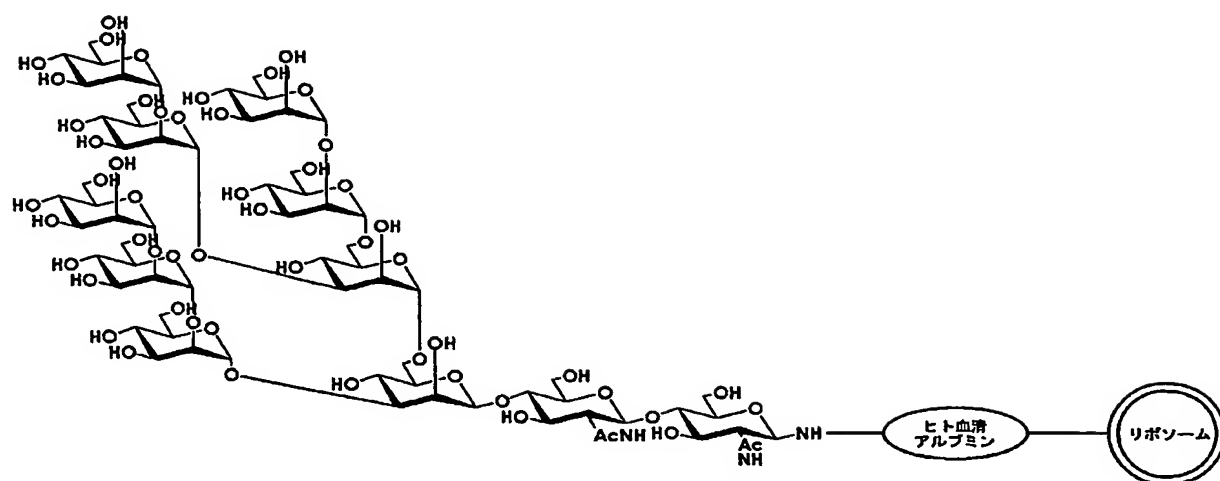
【図 10】



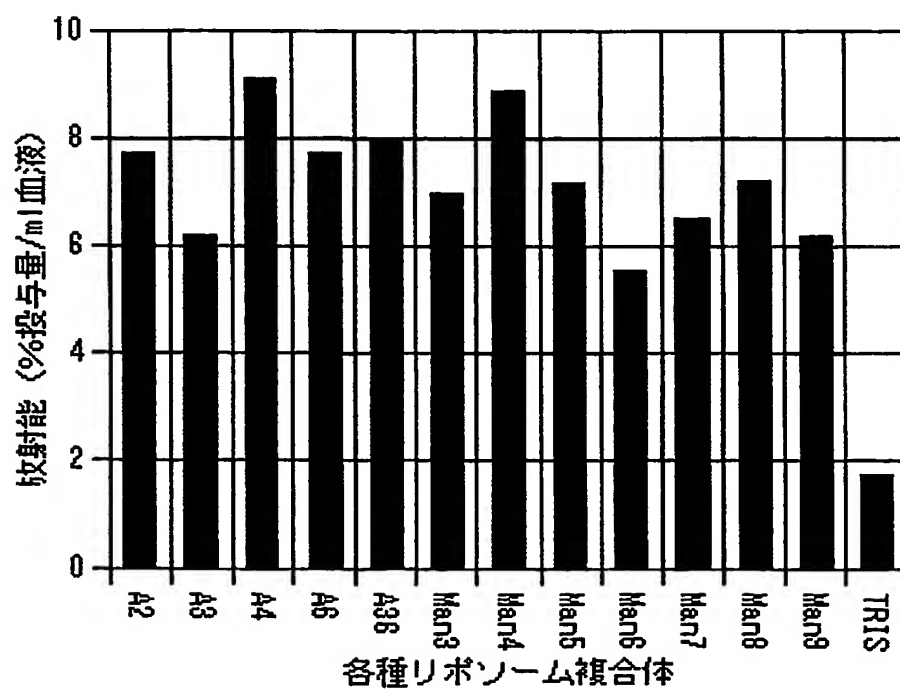
【図 11】



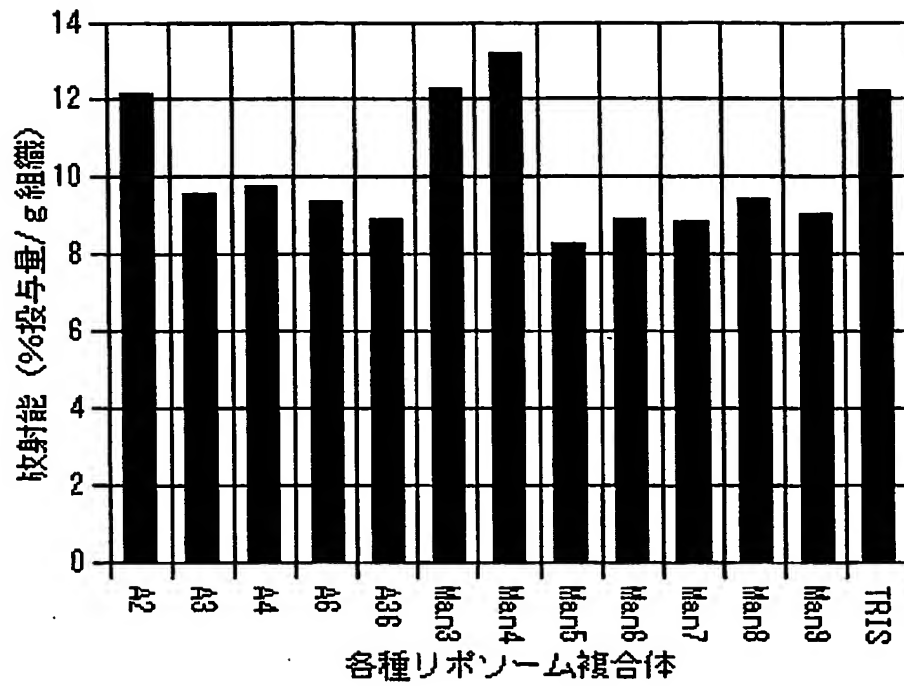
【図 12】



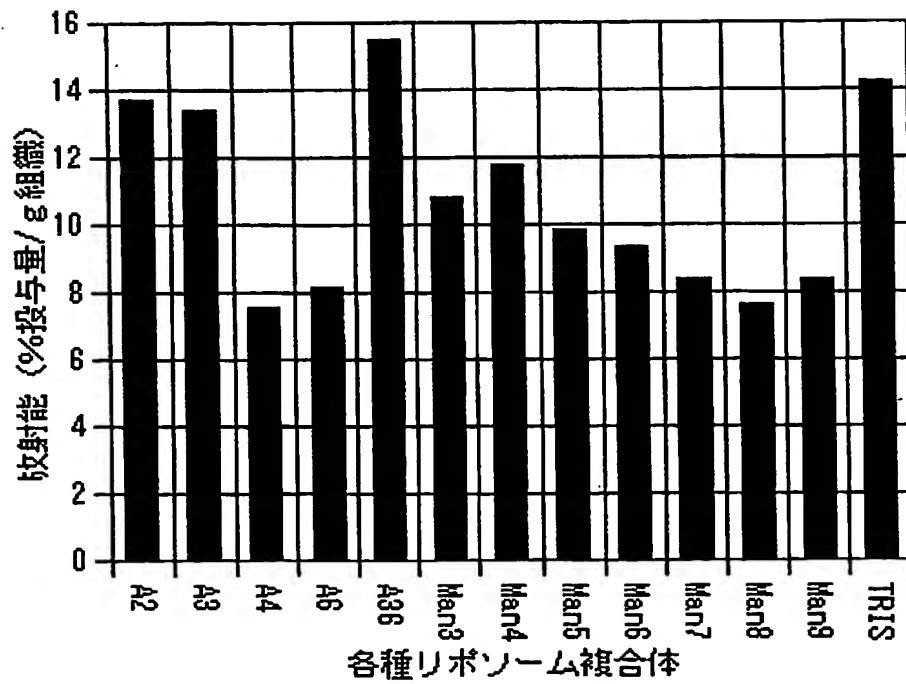
【図 13】



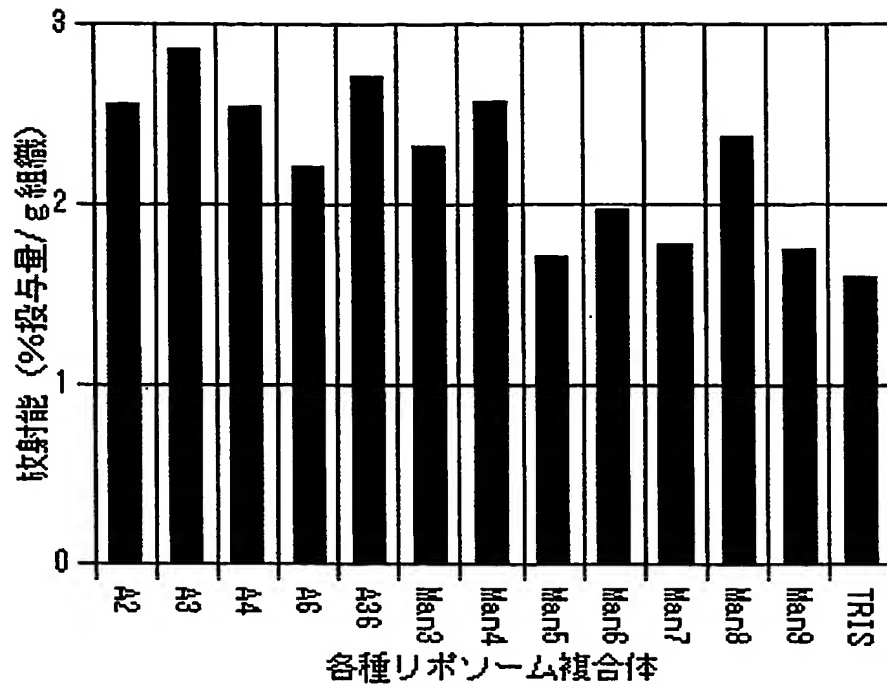
【図 14】



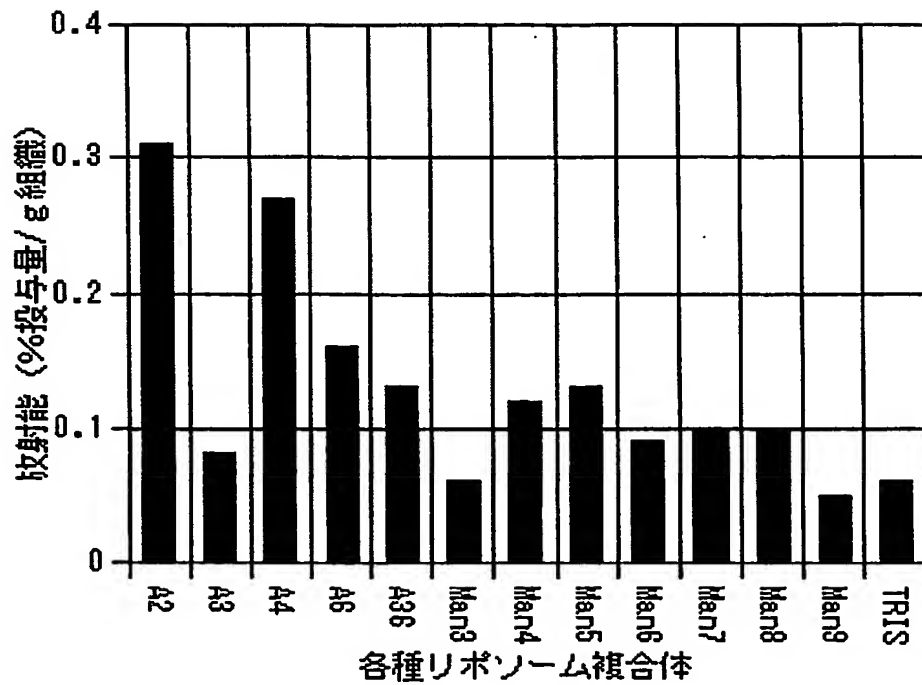
【図 15】



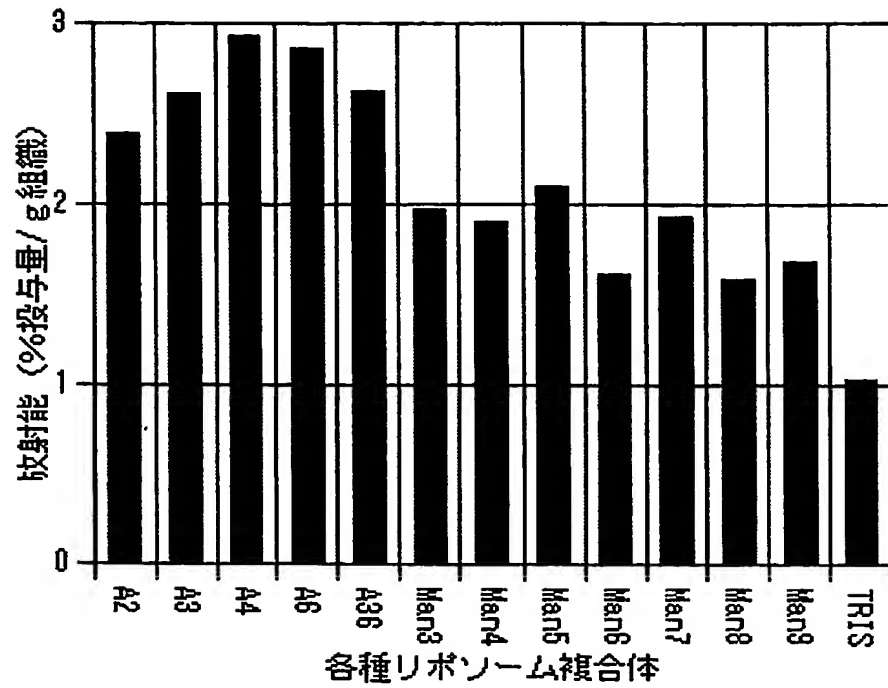
【図 16】



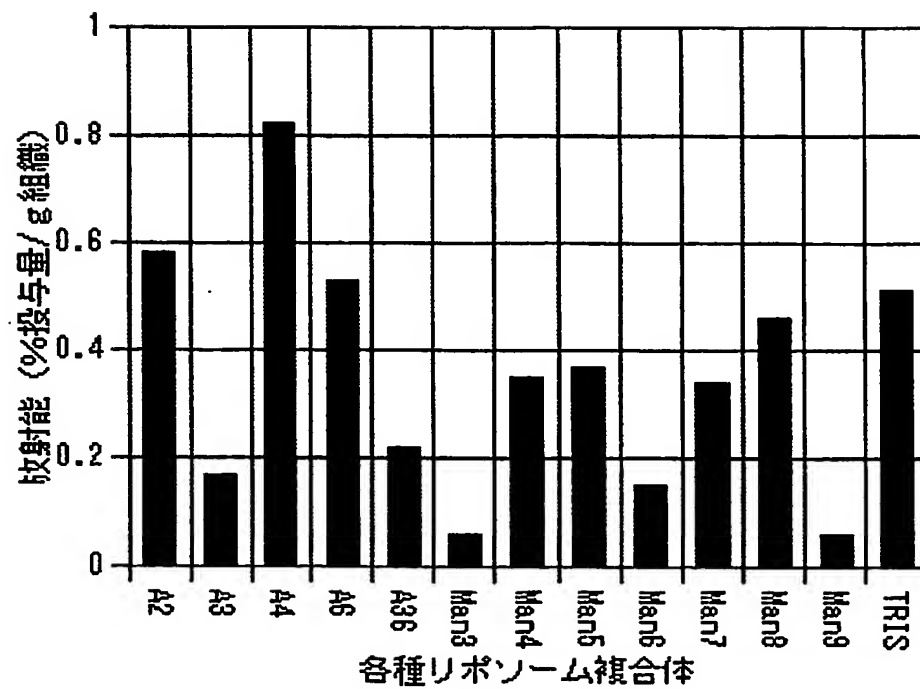
【図 17】



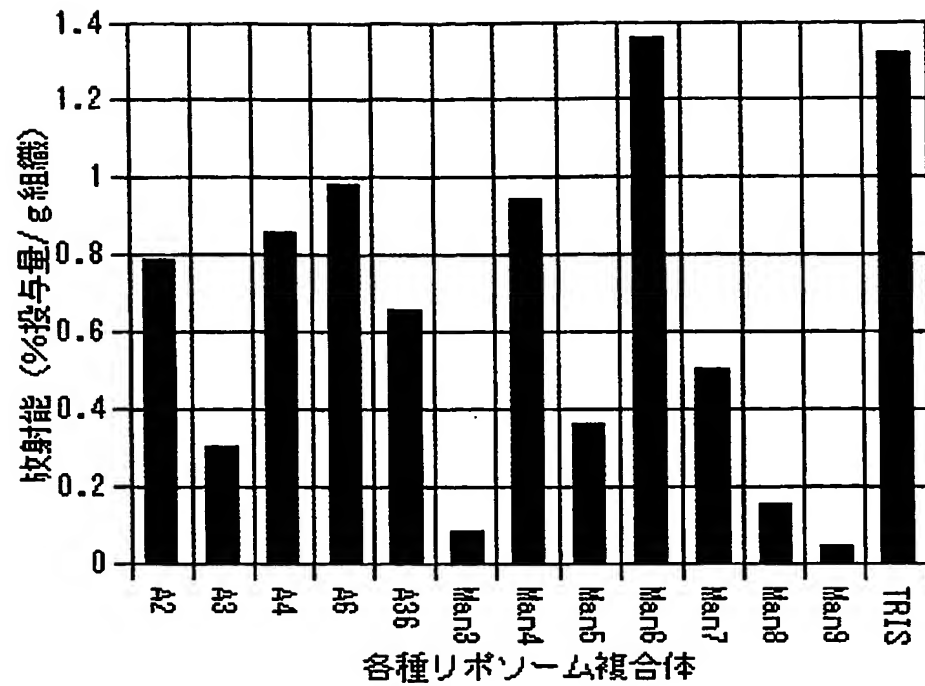
【図 18】



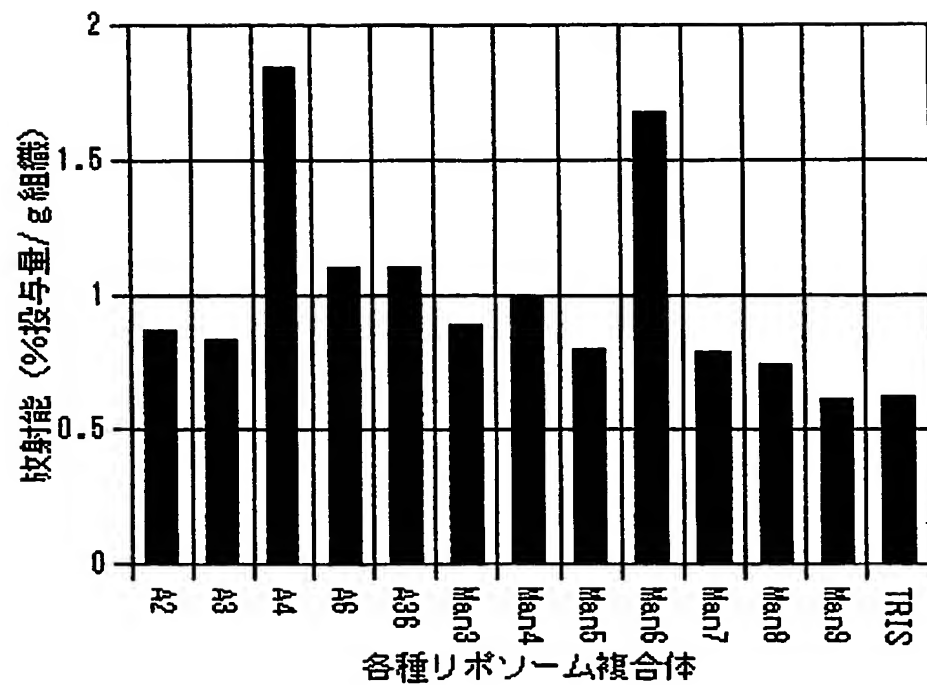
【図 19】



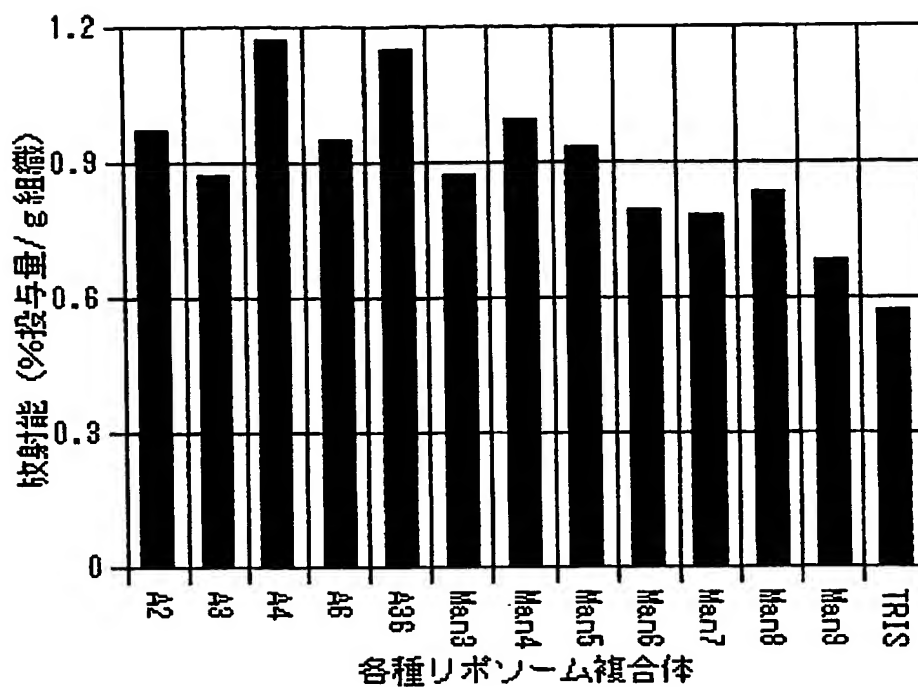
【図 20】



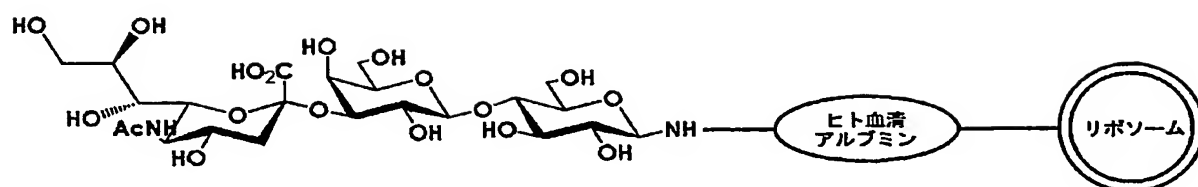
【図 21】



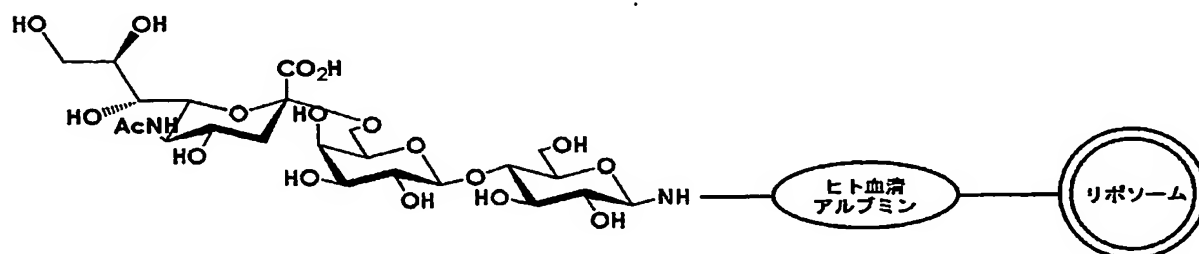
【図22】



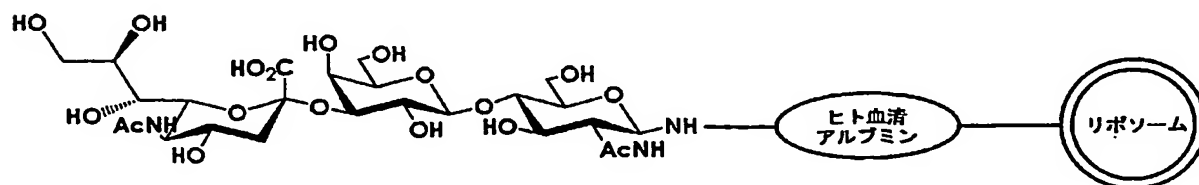
【図23】



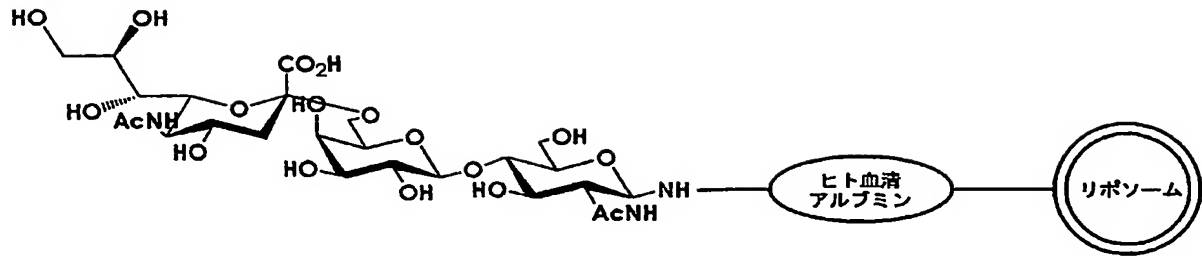
【図24】



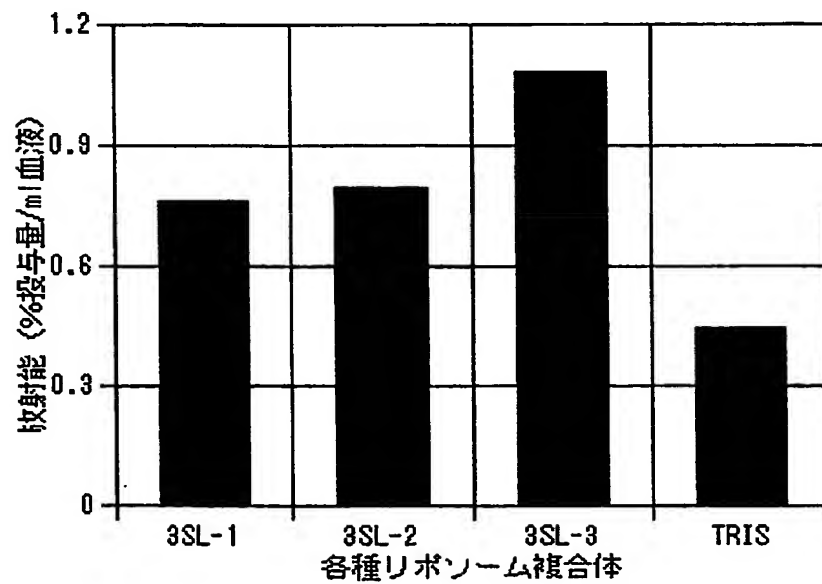
【図25】



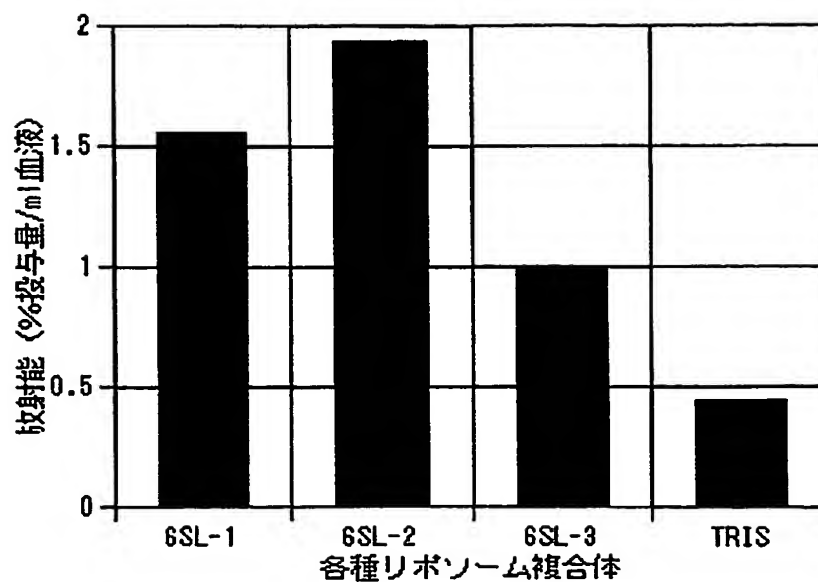
【図 26】



【図 27】

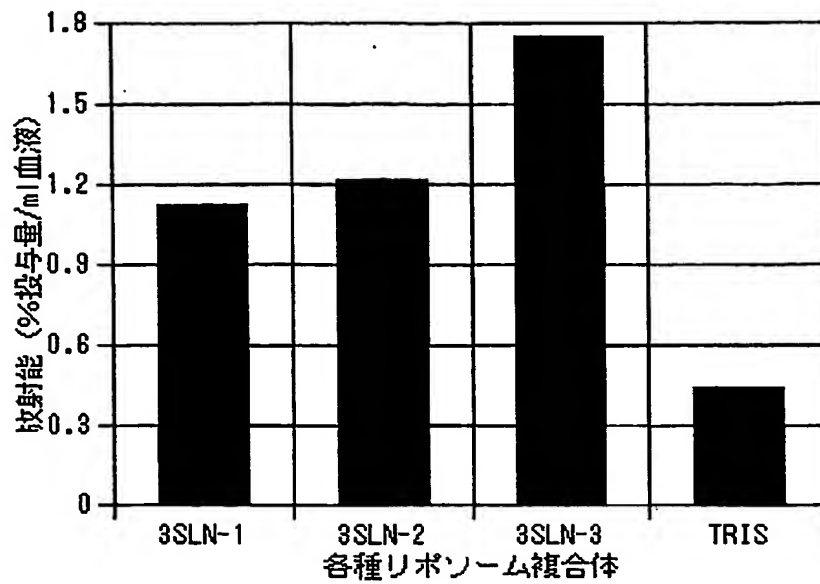


【図 28】

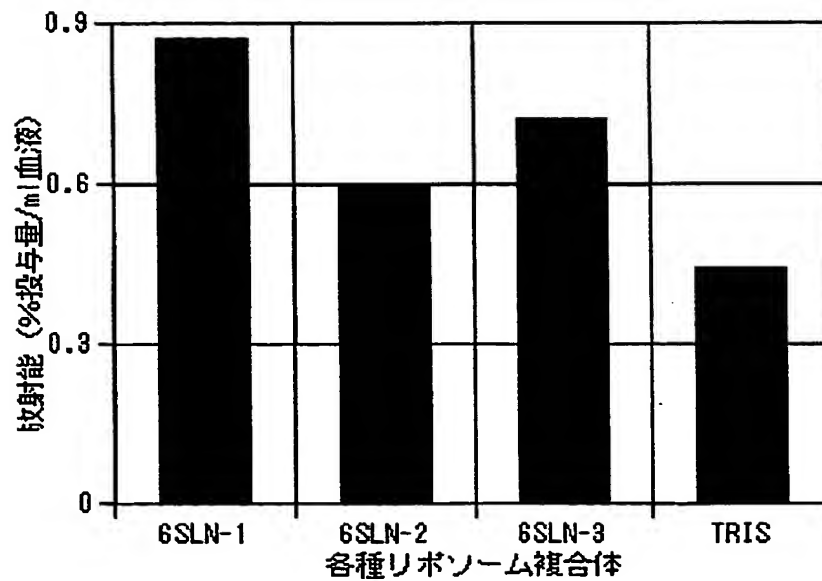




【図 29】



【図 30】



【図 31】



**【書類名】 要約書****【要約】**

**【課題】** 各種組織の細胞表面上に存在する各種のレクチン（糖鎖認識蛋白質）に対して特異的な結合活性を有する糖鎖を結合したリポソームであって、実際の生体内の細胞、組織を識別して薬剤あるいは遺伝子を効率的に輸送し得るリポソームを提供することを目的とする。

**【解決手段】** 糖鎖がリポソーム膜に結合されているものであって、糖鎖が、アルファ1,2マンノビオース二糖鎖、アルファ1,3マンノビオース二糖鎖、アルファ1,4マンノビオース二糖鎖、アルファ1,6マンノビオース二糖鎖、アルファ1,3アルファ1,6マンノトリオース三糖鎖、オリゴマンノース3五糖鎖、オリゴマンノース4b六糖鎖、オリゴマンノース5七糖鎖、オリゴマンノース6八糖鎖、オリゴマンノース7九糖鎖、オリゴマンノース8十糖鎖およびオリゴマンノース9十一糖鎖からなる群から選ばれたものであることを特徴とする糖鎖修飾リポソームならびに糖鎖がリポソーム膜に結合されているものであって、糖鎖が、3'-シアリルラクトース三糖鎖、6'-シアリルラクトース三糖鎖、3'-シアリルラクトサミン糖鎖および6'-シアリルラクトサミン糖鎖からなる群から選ばれたものであることを特徴とする糖鎖修飾リポソーム。

**【選択図】** なし

特願 2 0 0 3 - 2 8 5 4 3 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 3 0 1 0 2 1 5 3 3 ]

1. 変更年月日

2 0 0 1 年 4 月 2 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区霞が関 1 - 3 - 1

氏 名

独立行政法人産業技術総合研究所